

UNIVERSITÉ DE PARIS
FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE 1933-1934

N° 23

**Action comparée des Bacilles Lactiques
de quelques composés du Phosphore
et de l'Ergostérol Irradié
dans le
Traitement du Rachitisme Expérimental.**

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME
DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(Pharmacie)

présentée et soutenue le Juillet 1934

Par HENRI VILLETTE

Pharmacien - Licencié ès Sciences
Lauréat de la Faculté de Pharmacie
Ancien Interne des Hôpitaux de Paris

Jury { MM. HÉRISSEY, *Président.*
FABRE, *Professeur.*
RÉGNIER, *Agrégé.*

LE VÉSINET (S.-&-O.)
IMPRIMERIE CHARLES BRANDE
23, Rue du Maréchal-Foch

1934

**Action comparée des Bacilles Lactiques
de quelques composés du Phosphore
et de l'Ergostérol Irradié
dans le
Traitement du Rachitisme Expérimental.**

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME
DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(Pharmacie)

présentée et soutenue le Juillet 1934

Par HENRI VILLETTE

Pharmacien - Licencié ès Sciences
Lauréat de la Faculté de Pharmacie
Ancien Interne des Hôpitaux de Paris

Jury { MM. HÉRISSEY, *Président.*
FABRE, *Professeur.*
RÉGNIER, *Agrégé.*

LE VÉSINET (S.-&-O.)
IMPRIMERIE CHARLES BRANDE
23, Rue du Maréchal-Foch

1934

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

Administration

MM. GUÉRIN, Doyen, O. ✱, ☉ I.
P. LEBEAU, Assesseur, O. ✱, ☉ I.
P. DESPORT, Secrétaire, ✱, ☉ I.

Professeurs :

MM. GUÉRIN, O. ✱, ☉ I.	Botanique générale.
BÉHAL, Membre de l'Institut, G. O. ✱, ☉ I.	Chimie organique.
PERROT, O. ✱, ☉ I.	Histoire naturelle des Médicaments.
COUTIÈRE, O. ✱, ☉ I.	Zoologie.
LEBEAU, O. ✱, ☉ I.	Pharmacie chimique.
BOUGAULT, ✱, ☉ I.	Chimie analytique.
GORIS, ✱, ☉ I.	Pharmacie galénique.
TASSILLY, O. ✱, ☉ I.	Physique.
DAMIENS, ✱, ☉ I.	Chimie minérale.
HÉRISSEY, O. ✱, ☉ I.	Chimie biologique.
SOMMELET, ✱, ☉ I.	Hydrologie et Hygiène.
LUTZ, ✱, ☉ I.	Cryptogamie et Microbiologie.
FABRE, ✱, ☉ I.	Toxicologie.
LAUNOY, O. ✱, ☉ I.	Professeur sans chaire.

Doyen Honoraire : M. RADAIS, O. ✱, ☉ I.

Professeurs Honoraires : MM. DELÉPINE, O. ✱, ☉ I. et GUERBET, ✱, ☉ I.

Chargés de cours

MM. Marc HONNORAT, ✱, ☉ I.	Législation et Déontologie pharmaceutiques
LAUNOY, O. ✱, ☉ I.	Pharmacodynamie.
DELABY, ✱, ☉ I.	Minéralogie.
PICON, ☉ I.	Chimie minérale.
BACH, ☉ I.	Microbiologie.

Agrégés en exercice

MM. DELABY, ✱, ☉ A.	MM. BACH, ☉ I.
PICON, ☉ I.	BEDEL, ☉ I.
MASCRÉ, ☉ I.	RÉGNIER, ☉ I.
FLEURY, ☉ I.	

Chefs des travaux pratiques

MM. BEDEL, ☉ I., *agrégé* chargé des T. P. de
1^{re} année Chimie générale.
FLEURY, ☉ I. et RÉGNIER, ☉ I., *agrégés*,
chargés des travaux de Chimie analytique.
SOUÈGES, ☉ I. Micrographie.
LEROUX, ☉ I. Physique.
DEVAL, ✱, ☉ I. Microbiologie.
DELABY, ✱, ☉ I., PICON, ☉ I. et
MASCRÉ, ☉ I., *agrégés*, chargés des Travaux généraux de 4^e année
Bibliothécaire en Chef : M. BERNARD, ☉ I.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR H. HÉRISSEY,

*Professeur de Chimie Biologique
à la Faculté de Pharmacie de Paris
Pharmacien-chef de l'Hôpital Saint-Antoine*

*qui me fait le très grand honneur
de présider cette thèse, avec le témoi-
gnage de ma vive gratitude.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR RENÉ FABRE,

*Professeur de Toxicologie
à la Faculté de Pharmacie de Paris
Pharmacien-chef du Groupe Hospitalier Necker-Enf.-Malades*

*en remerciement de la bienveillance
qu'il m'a toujours témoignée.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ J. RÉGNIER,

Pharmacien-chef de l'Hôpital Ambroise-Paré

*en souvenir de mes années d'étude et
en gage de sincère admiration.*

A mon Maître et ami RAOUL LECOQ,
Pharmacien-chef de l'Hôpital de St-Germain-en-Laye

*à qui je dois le sujet de cette thèse,
en témoignage de vive gratitude
pour les conseils éclairés qu'il m'a
prodigués.*

A LA MÉMOIRE DE MES PARENTS.

MEIS ET AMICIS.

ACTION COMPARÉE DES BACILLES LACTIQUES
DE QUELQUES COMPOSÉS DU PHOSPHORE
ET DE L'ERGOSTÉROL IRRADIÉ
DANS LE TRAITEMENT DU RACHITISME EXPÉRIMENTAL

INTRODUCTION

Le rôle important que joue la flore microbienne intestinale, dans les phénomènes de putréfaction et de fermentation, a été démontré par de nombreux auteurs. La modification de cette flore, dans un sens bienfaisant, a été cherchée inconsciemment de temps immémoriaux par le changement de nourriture et, mieux encore, par l'absorption de lait aigri ou fermenté, source naturelle de bacilles producteurs d'acide lactique.

Du même ordre apparaît la supériorité sur le lait de vache du lait de femme, qui, dès le premier jour, entraîne l'apparition dans le tube digestif du jeune enfant, d'un microbe acidifiant particulier, découvert par TISSIER, et désigné sous le nom de *Bacillus bifidus*.

S'appuyant sur ces connaissances et sur un grand nombre d'autres faits d'expérience courante, METCHNIKOFF eut l'idée, au début de ce siècle, d'utiliser scientifiquement la fermentation lactique, en vue de modifier la flore intestinale, grâce à la production d'acide lactique dans le tractus digestif aux dépens des

sucres. De cette époque, date l'emploi toujours plus grand en thérapeutique, des ferments lactiques, sous forme de comprimés ou de liquides.

Au cours de notre pratique journalière, nous avons eu souvent à nous occuper de l'isolement et de la culture de ferments lactiques et de leur présentation en comprimés.

A l'occasion d'un échange d'avis sur cette question, notre ami Raoul LECOQ, Pharmacien-Chef de l'Hôpital de Saint-Germain-en-Laye, nous a incité à rechercher le rôle que pouvaient jouer les ferments lactiques dans l'évolution du rachitisme expérimental. Il a été observé maintes fois, en effet, que le développement de ce rachitisme entraîne une modification du milieu intestinal dans le sens alcalin, tandis que la guérison est marquée par un retour vers l'acidité.

Intéressé au plus haut point, nous avons sollicité notre ami de bien vouloir nous accueillir dans son laboratoire et de devenir notre Maître.

C'est ainsi, qu'entraîné et passionné par le sujet, nous avons été conduit à entreprendre toute une série de recherches connexes se rapportant à l'étiologie du rachitisme, à l'importance du déséquilibre phosphocalcique, à la correction de ce déséquilibre par divers dérivés phosphorés, et à la comparaison de l'activité de ces derniers et de la vitamine D, utilisée sous forme d'ergostérol irradié. | | |

Qu'il nous soit permis de remercier ici notre Maître et ami Raoul LECOQ qui, non seulement mit à notre disposition son laboratoire, mais nous consacra, avec une patience constamment renouvelée, une grande partie de son inépuisable activité. Sa précieuse collaboration nous a permis, bien qu'écarté de la recherche scientifique depuis longtemps déjà, de comprendre ces difficiles problèmes, de poursuivre quelques essais plus personnels, notamment sur le développement des bacilles lac-

tiques dans son rapport avec l'acide lactique produit, l'évolution de la flore intestinale parallèlement au rachitisme expérimental, et de mener à bien l'ensemble de ce travail.

Au cours des quatre chapitres, qui vont suivre, nous exposerons :

- I) Nos connaissances actuelles sur les modifications intestinales et humorales qui accompagnent la production du rachitisme expérimental;
- II) L'étude des bacilles lactiques et de leur action dans l'évolution de ce rachitisme;
- III) L'influence plus ou moins antagoniste exercée par le groupe phosphorique et le métal sur la calcification des lésions osseuses rachitiques;
- IV) L'influence de l'ergostérol irradié, spécialement de l'étalon international de vitamine D, en comparant son activité propre à celle des composés du phosphore actifs initialement utilisés.

Au terme de nos recherches qui ont nécessité la mise en œuvre d'animaux innombrables, un travail patient et assidu, des radiographies répétées, la préparation de régimes variés, de milieux de culture abondants et d'examen bactériologiques renouvelés, il nous est agréable de juger enfin, avec quelque recul, l'ensemble des matériaux accumulés et de remercier tous ceux qui, pour une part, ont facilité notre tâche, notamment M. Maurice PETIT, Directeur de l'Hôpital de Saint-Germain-en-Laye et M. le Docteur JARRY, chef de service de la radiographie, M. le Docteur J. MAHEU, micrographe-expert au Ministère de l'Agriculture, ainsi que M. Pierre SÉGUIN, assistant de l'Institut

Pasteur. Nos remerciements vont aussi à MM. Ch. WEISBREM, A. ALPÉRINE, A. TITOFF, ancien Professeur à l'Université de Moscou, L. BENENSON qui n'ont cessé de nous témoigner leur sympathie.

Qu'il nous soit permis enfin de marquer notre vive gratitude à notre Maître, M. le Professeur HÉRISSEY qui a bien voulu accepter de présider cette Thèse et nous a toujours marqué le plus grand intérêt depuis l'époque où, jeune interne, nous étions sous sa direction à l'Hôpital Broussais.

Nous exprimons également notre reconnaissance à M. le Prof. R. FABRE et M. le Prof. agrégé RÉGNIER, membres de notre jury, dont nous apprécions la haute compétence.

CHAPITRE PREMIER

MODIFICATIONS INTESTINALES ET HUMORALES OBSERVÉES DANS LE RACHITISME.

Suivant la définition du Professeur MARFAN, le rachitisme est une affection chronique de l'enfance caractérisée essentiellement par du gonflement, des déformations et du ramollissement des os. Cependant, les manifestations du rachitisme ne se limitent pas au squelette. Les altérations osseuses qui le caractérisent sont accompagnées de phénomènes morbides non moins importants, tels que anémie, hypertrophie des organes hématopoïétiques (ganglions lymphatiques, rate, foie, thymus), hypotonie musculaire, etc., et surtout de modifications humorales sur lesquelles nous aurons d'ailleurs l'occasion d'insister un peu plus loin.

Le rachitisme peut débuter durant toute la période de croissance correspondant à l'ossification; mais il apparaît plus souvent dans la jeune enfance que tardivement. Il s'observe aussi bien chez l'homme que chez les animaux.

Une des grandes découvertes du début du xx^e siècle a été précisément la production expérimentale, à coup sûr, d'une maladie très comparable au rachitisme, sur les animaux de laboratoire.

Ce rachitisme expérimental est-il rigoureusement superposable au rachitisme humain? Nous ne saurions l'affirmer. Il y a cependant entre eux, de nombreux points communs. Et il n'est pas douteux que le traitement du rachitisme humain s'est trouvé, au cours de ces dernières années, considérablement amélioré par l'expérimentation rationnellement conduite des substances antirachitiques sur l'animal.

Incontestablement, l'origine de ces deux maladies : rachitisme expérimental et rachitisme humain n'est pas identique. En effet, produit sur l'animal, il est obtenu à l'obscurité, à l'aide d'un régime privé de vitamine D antirachitique, d'une part, et présentant un déséquilibre phosphocalcique important, d'autre part. Ce dernier peut être dû à un large excès de phosphore, mais aussi, et plus habituellement, à un large excès de calcium. Le rachitisme humain, au contraire, si nous en croyons le Professeur MARFAN et son école, peut être aussi bien provoqué par un régime de carence et de déséquilibre minéral que par diverses infections du premier âge (en particulier la syphilis congénitale) ou intoxications chroniques dues à une alimentation inappropriée, et même à des troubles digestifs prolongés ou des tares héréditaires (enfants de mère éclamptique), etc.

*
* *

C'est sur le chien que MELLANBY produisit, le premier, du rachitisme typique. Par la suite, SHERMAN et PAPPENHEIMER obtinrent très régulièrement les mêmes effets sur le rat blanc. Cet animal offre l'avantage d'être plus maniable, aussi a-t-il été adopté par de nombreux expérimentateurs. Il permet une rigueur expérimentale très grande et l'emploi d'un régime mieux défini. Pour notre part, c'est celui que nous avons choisi dans les

essais que nous rapporterons dans ce travail. Reconnaissons cependant que le rachitisme peut être également observé sur le lapin, le poulet ou le singe.

L'emploi exclusif d'un régime rachitigène a pour premier effet de ralentir la croissance du sujet qui le reçoit, cet arrêt étant essentiellement dû à l'absence de la vitamine D antirachitique, fixatrice de calcium. Toutefois, le rachitisme apparaît d'autant plus nettement que la croissance est plus rapide. Tel est du moins le rachitisme « floride », habituellement reproduit. Une chute de poids, intervenant pendant l'expérience est d'ailleurs susceptible de provoquer une calcification d'inanition, cause ultérieure d'erreur dans l'interprétation. Le rachitisme « hypotrophique » qui s'observe alors même que le sujet perd du poids peut être également reproduit ; mais il nécessite l'adjonction de substances particulières, antifixatrices du calcium, sur lesquelles nous reviendrons au cours du Chapitre III.

Ces faits, étant bien précisés, l'action de la vitamine D sur la croissance se montre si importante que STEENBOCK, NELSON et BLACK ont proposé de prendre la variation de la courbe pondérale comme base d'appréciation dans le titrage du facteur antirachitique. Toutefois, COWARD, KEY et MORGAN font observer que, si la stimulation de la croissance apparaît en rapport avec la proportion de vitamine D ajoutée, l'exactitude d'un tel dosage serait assez aléatoire et ne vaudrait pas l'appréciation basée sur l'examen radiographique ou microscopique des modifications osseuses, techniques qui ont prévalu.

*
* *

En outre de l'influence sur la croissance, les auteurs se sont attachés à l'étude des modifications entraînées dans le tractus digestif, par les régimes synthétiques très particuliers (ne crai-

gnons pas de dire anormaux) qui produisent expérimentalement le rachitisme.

ZUCKER et MATZNER utilisant le régime rachitigène 401 composé de :

Farine de blé	85
Ovalbumine pulvérisée	10
Lactate de calcium	2,8
Citrate de fer	0,2
Chlorure de sodium	2

montrèrent les premiers que les fèces des rats rachitiques sont alcalines ($\text{pH} = 7,4$) mais qu'elles redeviennent acides ($\text{pH} = 6,2$ à $6,6$), de même que chez les rats normaux, quand la ration est additionnée d'huile de foie de morue.

Ces faits furent confirmés par JEPHCOTT et BACHARACH, lesquels, observant un rapport constant entre l'abaissement du pH fécal et la proportion de vitamine D adjointe à la ration, admirent la possibilité d'établir une méthode de dosage sur ces bases.

REDMAN, VILLIMOTT et WOKES ont, d'autre part, étudié la réaction ionique (pH) du contenu de différentes fractions du tube digestif chez le rat jeune et adulte, au régime normal, et ils ont constaté que les chiffres diffèrent peu dans l'un et l'autre cas.

	Rat adulte	Rat de 1 à 3 mois
Estomac	4,0	»
Duodénum	5,5	»
Jéjunum	6,0	6,8
Iléon.....	6,8	7,0
Caecum	6,5	6,7

Sous l'influence d'un régime rachitigène comme celui de ZUCKER, on constate une alcalinisation générale du tractus digestif, particulièrement nette au niveau du caecum et du gros

intestin. L'administration d'une source de vitamine D naturelle ou synthétique (huile de foie de morue ou cholestérol irradié) ramène le pH vers l'acidité, ainsi que le montrent d'ailleurs les résultats suivants empruntés à YODER.

	Duodénum	Iléon	Cæcum	Fèces
Régime rachitigène	6,72	7,39	8,14	7,54
Régime rachitigène plus irradiation	6,87	6,85	7,64	7,24
Régime rachitigène plus huile de foie de morue	6,46	6,90	7,55	7,04

De même GRAYZEL et MILLER ont observé, chez le chien, une tendance à l'alcalinisation de tout l'intestin, sous l'influence du régime rachitigène, et MELLANBY, un retour à la réaction acide sous l'influence de l'huile de foie de morue.

Comme on peut le constater d'après les chiffres précédents, des déterminations suffisamment précises peuvent être faites par l'examen des fèces; c'est à celles-ci que nous nous sommes limités. Nous avons d'ailleurs obtenu des chiffres très comparables, par l'emploi du régime RANDOIN-LECOQ, donné d'abord seul, puis avec addition d'ergostérol irradié, aussi bien sur des animaux de 35 à 45 grammes que de 100 à 125 grammes.

Au 7 ^e jour du régime, le pH atteint	7,3 à 7,5
Au 10 ^e jour, suivant l'adjonction d'ergostérol irradié, le pH est de	7,0 à 7,2
Au 5 ^e jour après remise au régime varié, le pH varie entre	6,6 et 7,1

Corroborant ces connaissances, MC CLENDON établit que l'addition de substances alcalinisantes à une ration rachitigène, accroît son action décalcifiante. Au contraire, l'adjonction ou, mieux, la substitution de chlorure de calcium au lactate de calcium (présent dans le régime) ne permettrait l'obtention que d'un rachitisme très réduit. L'addition de chlorure d'ammonium, acidogène, empêcherait également le développement de la maladie.

Si, du point de vue théorique, ces recherches sont en concordance avec les faits précédemment notés, KARELITZ et SHOHL ont observé des faits beaucoup moins nets avec la ration 2965 de STEENBOCK et BLACK, composée de :

Maïs	76
Gluten	20
Carbonate de calcium	3
Chlorure de sodium	1

Avant tout traitement, les fèces apparaissent plus ou moins alcalines; l'addition d'huile de foie de morue, les rend neutres parfois, mais laisse aussi subsister, dans quelques cas, une alcalinité manifeste. Les quelques déterminations de pH reproduites ci-dessous permettent de le constater :

Régime de STEENBOCK	7,41-8,00-7,43
Régime de STEENBOCK + huile de foie de morue.	6,93-7,00-7,32-7,68

Sans mettre en doute la bonne foi des expérimentateurs, la généralisation de leurs conclusions ne peut être admise sans discussion. En effet, OSER, employant le régime de STEENBOCK et BLACK, trouve une variation générale dans le sens d'une alcalinisation pendant la période de rachitisme et d'une acidification pendant la cure, mais les variations sont minimales et surtout inconstantes. La même incertitude se retrouve quand il étudie le pH du contenu intestinal.

Rat	Duodénum et Jéjunum	Iléon	Cæcum	Côlon
Normal	6,37	6,87	7,22	6,82
Rachitique	6,32	7,11	7,34	7,42

L'addition de chlorure d'ammonium, ainsi que le constatent ZUCKER, JOHNSON et BARNETT, n'entraîne pas de variations nettes de la réaction intestinale. D'ailleurs, l'action anti-rachitique de ce chlorure d'ammonium est contredite par ROGO-

ZINSKI; de même l'action du chlorure de calcium est niée par LECOQ et VILLUIS.

Les modifications du pH du contenu intestinal, ne sont donc pas rigoureuses et absolues. Elles traduisent pourtant, assez fréquemment, une différence dans l'assimilation des principes nutritifs présents dans le tube digestif, conditionnant vraisemblablement un trouble plus important des humeurs et spécialement du sang. En effet, YODER fait remarquer que les rats mis au régime rachitigène voient leur élimination intestinale du phosphore et du calcium très augmentée. Inversement, l'irradiation des animaux ou l'addition de vitamine D à la ration, restreint ces éliminations en même temps que le pH s'abaisse. Toutefois, selon KARELITZ et SHOHL, les régimes rachitigènes habituels tels que ceux de MC COLLUM et de STEENBOCK, s'ils provoquent une diminution de 50 % environ dans la rétention du calcium et de 20 % dans la rétention du phosphore, n'empêchent pas la balance calcique, ainsi que la balance phosphorique de rester positives malgré l'absence de vitamines antirachitiques. SHOHL, BENNETT et WEED ont observé des faits du même ordre chez le chien. Ces balances ne deviendraient incontestablement négatives que dans le rachitisme hypotrophique.

*
* *

Voyons maintenant les modifications sanguines. Avec le régime 3.143 de MC COLLUM, composé de :

Blé	33
Maïs	33
Gélatine	15
Gluten	15
Carbonate de calcium	3
Chlorure de sodium	1

WOENCKENHAUS a observé, dans le sang des rats, une diminution du taux de l'hémoglobine, une anémie et une leucopénie marquée, ainsi que l'apparition de formes de transition, myélocytes et normoblastes. Il semble, toutefois, que ces derniers caractères traduisant une lésion médullaire, soient exceptionnels dans le rachitisme expérimental, car les auteurs signalent que la moelle osseuse n'est, en général, pas atteinte.

Les modifications les plus intéressantes sont celles qui portent sur la teneur en phosphore et en calcium du sang. Selon BENJAMIN et HESS, le calcium se présente, dans le sérum normal, sous quatre formes : un complexe calcophosphorique adsorbable par le sulfate de baryum, une partie de calcium ionisé (tous deux diffusibles et dans la proportion de 2 à 1) ; un complexe différent du premier, adsorbable mais non diffusible, et une fraction non adsorbable et non diffusible engagée en combinaison avec les protides.

Le phosphore minéral ne fut trouvé dans le sérum normal que sous deux formes, l'une étant précisément celle où le phosphore est engagé avec le calcium pour former le complexe signalé précédemment. Dans le rachitisme expérimental du rat, provoqué au moyen du régime 3.143 de MC COLLUM, les proportions globales de calcium ultrafiltrable ou non, ne semblent pas modifiées ; le changement consiste en une diminution de la fraction adsorbable et une augmentation des formes ionisées et protéiques.

Nous reproduisons ci-après les chiffres de calcémie et de phosphatémie, trouvés chez les rats normaux et atteints de rachitisme expérimental, pour 100 cm³ de sérum.

	Ca. en milligrammes	P. en milligrammes
Chez le rat normal	10 à 12	5 à 6
Chez le rat rachitique	7 à 8	2 à 4

La phosphatémie et le plus souvent aussi, la calcémie se relèvent quand on ajoute au régime rachitigène une source de

phosphore actif, de l'huile de foie de morue ou de l'ergostérol irradié (sources de vitamine D), ou encore si on irradie les animaux. Il en est de même dans le jeûne, sous l'influence de l'inanition.

C'est surtout la chute de la phosphatémie qui a été considérée par les divers auteurs comme le caractère essentiel du rachitisme, la chute de la calcémie étant plus irrégulière. L'hypophosphatémie a d'ailleurs été observée aussi bien par SHARPE, chez le chien, que par STARE et ELVEHJEM, chez le veau, et par ACKERSON, BLISH et MUSSEHL, chez les volailles; notons en passant que ces derniers auteurs trouvent plus constamment l'hypocalcémie chez celles-ci que chez les rats.

Hypophosphatémie et hypocalcémie ont été retrouvées d'autre part, par LECOQ, chez des cobayes recevant un régime rachitigène; toutefois, ces animaux, ainsi que Mme RANDOIN et LECOQ l'ont montré, ne présentent pas de rachitisme vrai: ils présentent même plus volontiers, selon LECOQ, dans ces conditions expérimentales, un syndrome ostéo-dystrophique voisin du scorbut que du rachitisme.

L'hypophosphatémie, qui est une règle dans le rachitisme expérimental, se retrouve également dans le rachitisme humain. Les observations de LESNÉ, DE GENNES et GUILLAUMIN, à ce propos, sont assez typiques.

Il faut savoir cependant, comme l'ont montré HESS, WEINSTOCK, RIVKIN et GROSS, qu'on peut observer, aussi bien chez l'homme que chez l'animal, des cas typiques de rachitisme sans hypophosphatémie véritable. Inversement, des guérisons de lésions osseuses par l'huile de foie de morue ont pu être obtenues sans relèvement concomitant du phosphore sérique.

Différents auteurs ont étudié les variations de la calcémie et de la phosphatémie chez les rats soumis à divers régimes rachitigènes et ont cru trouver un rapport intéressant entre ces deux

facteurs. Selon HOWLAND et KRAMER, on pourrait utiliser comme méthode d'appréciation, le produit du calcium sérique et du phosphore minéral, ces éléments étant exprimés en milligrammes pour 100 cm³. Si ce produit est inférieur à 30, le rachitisme existe; s'il est compris entre 30 et 40, il est probable; au-delà, de 40, il y a absence de rachitisme ou guérison. Selon ADAMS et MC COLLUM la connaissance des ions calcium et phosphore, calculée par la méthode de HOLT, serait non moins intéressante, et permettrait d'apprécier plus exactement encore l'acuité du rachitisme. La valeur du produit (ions Ca)³ × (ions PO⁴)² indique un rachitisme¹ actif s'il est inférieur à 8×10^{25} et, au contraire, une absence de rachitisme ou la guérison, s'il dépasse ce chiffre.

KAY a, d'autre part, étudié très particulièrement la teneur en phosphatase du plasma sanguin, en appréciant l'action hydrolysante de cette enzyme sur le β -glycérophosphate de sodium. Une augmentation considérable de la phosphatase a été trouvée, dans un grand nombre de maladies décalcifiantes, notamment l'ostéite déformante, l'ostéomalacie et le rachitisme. Ces faits furent confirmés ultérieurement par BODANSKY, JAFFE et CHANDLER, chez le chien.

* * *

Parallèlement, à ces variations, on observe des modifications importantes dans la composition minérale des tissus. Le corps des rats rachitiques contient, selon MC CANN et BARNETT, moins de phosphore et de calcium pour 100 grammes de poids vif que celui des rats normaux. Ces auteurs donnent les chiffres suivants.

	Pourcentage du poids vif	
	P.	Ca.
Rats normaux	0,41	0,79
Rats rachitiques	0,30	0,50

Dans les muscles striés des rats, soumis au régime rachitigène de BURR et BURR, HAURY ne retrouve plus que 41 milligrammes 6 de calcium pour 100 grammes de substances desséchées contre 74 milligrammes chez les rats normaux.

D'autre part, HESS, GROSS, WEINSTOCK et BERLINER observent une chute importante du calcium total et du phosphore minéral dans le cerveau des rats, soumis au régime rachitigène 3.143 de MC COLLUM.

Plus particulièrement, sur les os, un grand nombre de résultats expérimentaux indique une diminution très marquée du taux des cendres. Le parallélisme est si net que cette diminution a pu également être proposée, par certains, comme base d'appréciation du degré de rachitisme et de sa prévention ou de sa guérison. Pour intéressante et si marquée qu'elle soit, l'analyse chimique ne saurait cependant se substituer à l'examen histologique des lésions, car elle risquerait d'entraîner la confusion entre les lésions d'ostéoporose et les lésions de rachitisme vrai.

Les résultats que nous reproduisons, d'après MOURIGUAND, LEULIER, BERNHEIM et Mlle WEILL, sont particulièrement nets :

	Cendres p. 100 d'os secs		P ² O ⁵ p. 100 d'os secs	
	Diaph.	Epiph.	Diaph.	Epiph.
Rats normaux	62,76	51,53	26,40	18,84
Rats soumis au régime de PAP- PENHEIMER	47,67	35,58	20,05	12,84

La décalcification osseuse qu'ils décèlent s'accompagne de modifications histologiques aisément observées par radiographie et qui seules sont caractéristiques du rachitisme. Ces modifications portent, en particulier, sur l'élargissement de la zone cartilagineuse de la tête (épiphyse) du tibia et de l'humérus; deux points qu'il importe de vérifier.

La décalcification osseuse apparaît en rapport avec l'état du sérum sanguin. Il suffit, en effet, de plonger *in vitro* un fragment osseux d'animal rachitique dans du sérum de rat normal, pour voir un dépôt calcaïque se produire aussitôt. Un excès ou un appauvrissement du sérum en chlorure de sodium ou de potassium ou un excès de magnésium inhibent le dépôt de calcium *in vitro*. Inversement, il ne se produit aucune modification lorsque l'os est plongé dans du sérum sanguin de rats rachitiques. Le rachitisme a vraisemblablement provoqué dans le sérum de l'animal malade, un déséquilibre phosphocalcique qui est cause du manque de calcification.

Il est d'ailleurs possible de réaliser un sérum artificiel permettant *in vitro* la calcification des os rachitiques, en dissolvant dans un litre d'eau distillée, les éléments suivants :

PO ⁴ KH ²	0 gr. 263
SO ⁴ Mg	0 gr. 091
CO ³ NaH	4 gr. 850
KCl	0 gr. 235
NaCl	5 gr. 650
CaCl ²	0 gr. 167

* * *

Ces connaissances, rapidement exposées, nous montrent qu'il y a, à l'origine du rachitisme, une perturbation dans l'assimilation et l'utilisation phosphocalcique. Cette perturbation peut être provoquée, dans le rachitisme expérimental, directement par le régime. Au contraire, dans le rachitisme humain, il n'y aurait pas à proprement parler carence dans le régime; mais un trouble digestif encore mal connu interviendrait empêchant l'assimilation. Sachons, par exemple, que la diminution ou la suppression de la sécrétion biliaire augmente le besoin du sujet en

vitamine D et, par conséquent, le prédispose d'autant au rachitisme. On pourra également se trouver en présence d'un trouble du métabolisme, d'une infection ou d'une insuffisance endocrinienne, aboutissant à des modifications humorales comparables à celles du rachitisme expérimental.

Le plus souvent donc, il y aurait à l'origine un défaut d'assimilation intestinale, dont la modification du pH est l'indice, et conduisant, plus ou moins directement, à une manifestation d'hypophosphatémie.

Selon BLUM, DELAVILLE et VAN CAULAERT, l'hypophosphatémie serait sous la dépendance de la réserve alcaline du sang; l'excès d'anhydride carbonique faisant émigrer une partie du phosphore du plasma dans les globules rouges. Sous la même influence, le calcium colloïdal diminue et le calcium ultra-filtrable augmente.

Le processus de l'ossification se trouve profondément perturbé. On sait, depuis les travaux de LOEB, que les albumines sont des ampholytes, c'est-à-dire que leur caractère est acide ou basique selon les milieux. Pour que les albumines du tissu chondroïde fixent le calcium, il faut que les bases lui confèrent une réaction acide; la précipitation calcique sanguine n'est possible elle-même qu'en milieu également alcalin. L'excès de CO_2 dans le sang des rachitiques explique à la fois l'arrêt de la calcification et de la décalcification. Plus récemment, LEENHARDT et CHAPTAL ont confirmé ces faits et montré que l'exposition aux rayons ultraviolets provoque une élévation de la réserve alcaline des enfants, qui s'oppose aux manifestations du rachitisme et de l'hypothyroïdie. Il se peut également que les phosphatides organiques du sang ainsi que la cholestérine et ses éthers interviennent conjointement à l'acide carbonique circulant dans les phénomènes de calcification. Quoi qu'il en soit, une preuve des modifications physicochimiques de l'état humoral fut donnée par EDERER qui

observa, sous l'action de l'huile de foie de morue, une augmentation de la viscosité du sérum.

D'une étude très serrée de POLICARD, PEHU et BOUCOMONT, il résulte d'ailleurs que, dans le rachitisme, le trouble humoral joue un rôle de premier plan. La substance ostéoïde se montre bien apte à fixer le calcium, et la phosphatase, indispensable pour assurer une concentration locale convenable en sel de chaux inorganique, existe en quantités plus que suffisantes; mais l'une et l'autre ne peuvent rien, tant que les os sont baignés d'humeurs rachitiques.

Cependant, pour le Professeur MARFAN et ses collaborateurs, spécialement J. DEBRAY, les lésions osseuses rachitiques sont fréquemment, chez l'enfant, d'origine irritative. Elles consistent dans une prolifération de la moelle osseuse d'abord cellulaire, puis conjonctive, une prolifération désordonnée du cartilage conjugal (sérié et hypertrophique) qui est envahi par des vaisseaux et par une production excessive d'un tissu osseux incomplètement ou non calcifié (tissu ostéoïde). C'est le mélange irrégulier de ces trois tissus qui forme le tissu spongoïde, caractéristique du rachitisme.

Il est probable que les glandes endocrines interviennent également, plus ou moins directement, dans la production du rachitisme. MURRAY a observé, en particulier, sur la thyroïde du chien rachitique, une hyperplasie aiguë ou chronique qui ne se retrouve pas dans les carences calciques.

RÉMOND, SOULA et CAUQUIL ont montré, d'autre part, que l'ablation de la rate, pratiquée sur des lapins, peu après la naissance, s'accompagne de troubles osseux qu'ils ont comparé au rachitisme, en se basant uniquement sur les teneurs en cendres du calcium et du phosphore des os. Les radiographies, prises au cours de ce travail et reproduites dans la thèse de CAUQUIL, nous font

penser qu'il ne s'agit pas ici de rachitisme vrai, mais vraisemblablement d'ostéoporose.

Il se peut cependant qu'une insuffisance endocrinienne intervienne dans l'élaboration du stérol ou, tout au moins dans son activation chez l'animal rachitique. Les rats blancs soumis au régime rachitigène 3.143 ne sont pas influencés par l'addition de 10 % d'excréments de rats normaux. Par contre, les excréments de rats normaux irradiés empêchent l'apparition du rachitisme. Les sujets rachitiques renferment donc, dans leur organisme, de la provitamine qu'ils sont incapables de transformer en vitamine D.

* * *

En conclusion, nous dirons que, chez l'animal comme chez l'enfant, les modifications humorales, qu'elles aient pour origine une modification du régime, un trouble de l'assimilation intestinale, une intoxication ou une infection, sont la cause primordiale des lésions osseuses qui constituent le rachitisme.

CHAPITRE II

ÉTUDE DES BACILLES LACTIQUES ET DE LEUR ACTION SUR LE RACHITISME EXPÉRIMENTAL.

Les modifications humorales observées dans le rachitisme, se montrent, ainsi que nous venons de le voir, dans un grand nombre de cas, sous la dépendance de l'alcalinisation du tractus digestif de l'animal ou de l'enfant.

Différents auteurs ont d'ailleurs très justement attiré l'attention sur l'importance de la flore intestinale des nourrissons. Il semble, ainsi que le rappellent G. MOURIQUAND et ses collaborateurs, que les sels de chaux ne soient bien utilisés qu'en milieu acide. Là se trouve, sans doute, la raison de l'action si différente que peuvent exercer chez l'enfant, le lait de vache et le lait maternel.

Le lait de vache, très riche en calcium et en phosphore, apparaît en effet plus rachitigène que le lait humain, moins riche en calcium et en phosphore. L'explication d'une telle anomalie serait la suivante : les selles du nourrisson au lait de femme, contiennent seules, le *Bacillus bifidus* qui entretient l'acidité du milieu intestinal et permet sans doute une absorption parfaite du calcium du lait humain, déjà, par lui-même, très assimilable.

Par contre, la flore des selles du nourrisson au lait de vache est rarement acide, généralement alcaline, et entretient, de ce fait, un milieu intestinal infiniment moins favorable à l'absorp-

tion du calcium. Sans doute, d'autres causes agissent et peuvent expliquer la fréquence relative du rachitisme chez l'enfant au biberon, maladie rare chez l'enfant au sein; mais cette cause intestinale mérite d'être retenue.

L'usage du babeurre, du lactosérum, et des laits fermentés : yoghourt et kéfir, chez l'enfant et l'adulte présentant des troubles digestifs, vient à l'appui du fait précédent.

On pouvait donc se demander si l'ingestion de bacilles lactiques, bon modificateurs de la flore intestinale, dans le sens acide, ne serait pas à recommander aux enfants ou animaux rachitiques. Ces bacilles, ajoutés à une ration rachitigène, n'en pourraient-ils neutraliser les effets au même titre que l'ergostérol irradié, l'huile de foie de morue ou l'une des formes actives du phosphore? Il nous a semblé curieux de le rechercher.

Auparavant et pour résoudre cette question dans les conditions les meilleures, nous nous sommes proposé de mettre en évidence une source particulièrement active de bacilles lactiques, celle-ci devant être facilement incorporée dans la ration alimentaire de nos animaux.

* * *

Les préparations pharmaceutiques de bacilles lactiques sont, comme on sait, de valeur très inégale et ne pouvaient être utilisées sans contrôle.

Déjà GRIMBERT, en 1909, ayant eu l'occasion d'examiner quelques échantillons de ferments lactiques vendus dans le commerce sous des noms déposés, signalait que l'activité de ces produits, laissait souvent à désirer; quelques-uns même se montrant dépourvus de toute action.

En Allemagne, LUERSEN et KUHN ont signalé dans les préparations pharmaceutiques similaires des microbes protéolytiques totalement étrangers à la fermentation lactique et *souillant* les cultures,

BERTHELOT et BERTRAND, ayant examiné, d'autre part, un grand nombre d'échantillons de ferments lactiques commerciaux, concluent à la nécessité de leur contrôle bactériologique; sur 12 échantillons de comprimés, 7 étaient restés complètement stériles. Ils isolèrent également de certains specimens des microbes protéolytiques aérobies et anaérobies, parmi lesquels le *Bacillus subtilis*, le *B. mesentericus*, un *B. fluorescens liquefaciens* et exceptionnellement le *Bacillus perfringens*.

Nous avons donc commencé par vérifier l'activité de quelques comprimés lactiques d'origine différente, qui se trouvaient à notre disposition. Lorsque cela était possible, nous avons même isolé les bacilles lactiques eux-mêmes et préparé des cultures pures sur lait.

La première question à résoudre était la suivante : pouvions-nous employer directement, comme source de bacilles lactiques, la poudre de comprimés au bien devons-nous, au contraire, régénérer le ferment pur en lui redonnant une activité nouvelle par des cultures appropriées?

Parallèlement à ce problème, en vue de nous éclairer sur le choix des bacilles à utiliser, nous avons cherché à savoir si la différence observée dans la production de l'acide lactique dépend de la race des bacilles mis en œuvre, de la rapidité plus ou moins grande que ceux-ci présentent à se développer, et enfin, si la production d'acide reste toujours proportionnelle à la quantité de bacilles engendrés.

Dans une première série d'expériences, nous avons commencé avec 1 cc. 5 d'une culture pure sur lait datant de 24 heures de bacilles lactiques (*Bacillus bulgaricus*) récemment isolés, des ballons de 500 cm³ de bouillon de touraillon carbonaté, préparé de la façon suivante, selon la technique de Gabriel BERTRAND :

a) Faire bouillir pendant un quart d'heure :

Touraillon d'orge	30 gr.
Eau distillée	1000 cm ³

b) Filtrer sur coton, et ajouter :

Peptone	10 gr.
Lactose	20 gr.

c) Faire dissoudre, filtrer, répartir par 500 cm³ dans des ballons et ajouter dans chacun d'eux 3 % de carbonate de chaux précipité. Le volume de 500 cm³ qui fut adopté donne, en effet, des résultats plus constants que le volume de 100 cm³ initialement préconisé par MAHEU, pour l'appréciation de l'activité lactique d'un échantillon donné (1).

d) Stériliser à l'autoclave à 110°.

Les ballons ensemencés sont maintenus à l'étuve à 37°.

Puis, nous avons dosé l'acide lactique produit et déterminé la quantité de bacilles développés à des périodes variables, échelonnées sur 17 jours.

Le dosage de l'acide lactique fut conduit selon le procédé de MAHEU, en tenant compte de la technique de KRAMER, modifiée par CLARK et COLLIP, qui est appliquée au dosage du calcium sanguin.

A 20 cm³ de bouillon filtré et maintenu à l'ébullition, acidifié par 2 cm³ d'acide acétique, on ajoute 30 cm³ par exemple d'une solution décimale d'oxalate d'ammoniaque. S'assurer après repos, qu'une nouvelle addition d'oxalate ne produit plus de précipitation (2). L'oxalate de chaux formé, rassemblé par centrifugation, est lavé à l'eau froide additionnée de 2 % d'ammoniaque puis centrifugé à nouveau et repris avec 20 cm³ environ d'acide sulfurique au 1/10. L'acide sulfurique décompose l'oxalate de calcium et l'acide oxalique mis en liberté est titré, au bain-marie à 60-80° au moyen d'une solution décimale de permanganate de potassium (1 cm³ = 0 gr. 009 d'acide

(1) Cette modification fut faite sur le conseil verbal de J. MAHEU.

(2) La dose qui est indiquée dans la technique de MAHEU est souvent insuffisante.

lactique). Ce dosage est opéré parallèlement sur un ballon témoin non ensemencé et la différence, seule, est retenue.

En ce qui concerne la numération des bacilles, au lieu d'adopter la méthode employée habituellement pour dénombrer les germes de l'eau par ensemencement sur plaques de gélatine, rappelée par MAHEU et appliquée incidemment par cet auteur, nous avons utilisé la cellule de THOMA, après stabilisation des germes par le formol et coloration par addition de quelques gouttes de fuchsine phéniquée concentrée.

Dans ces conditions, nous avons obtenu les résultats reproduits dans le tableau ci-après :

Durée de la culture	Nombre de germes par mm ³	Acide lactique par litre
18 heures	2.860.000	1,96
24 »	19.132.000	6,04
32 »	29.500.000	12,70
48 »	48.800.010	16,83
66 »	58.000.000	18,18
72 »	65.332.000	18,67
120 »	86.800.000	20,52
168 »	78.800.000	20,43
408 »	4.936.000	21,15

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons utilisé pour nos ensemencements deux cultures fraîches, sur lait, de bacilles lactiques (N^o 1 et N^o 2), préparées dans les mêmes conditions que précédemment, à partir de 2 souches différentes, et 3 variétés de comprimés du commerce (N^o 3, N^o 4 et N^o 5), à raison de 0 gr. 50 de la partie centrale prélevée aseptiquement, toujours pour 500 cm³ de bouillon de touraillon carbonaté. Le dosage de l'acide lactique et la numération des bacilles ont été effectués, dans ces 5 cas, au bout de 24 heures et 48 heures. Les chiffres ainsi obtenus sont consignés ci-dessous :

I) Cultures liquides	Nombre de germes par mm ³	Acide lactique par litre
Après 24 heures — N° 1	20.270.000	5,86
» 24 » — N° 2	29.080.000	2,36
» 48 » — N° 1	46.790.000	15,45
» 48 » — N° 2	40.400.000	8,91
II) Comprimés du commerce		
Après 24 heures — N° 3	17.350.000	2,09
» 24 » — N° 4	3.160.000	0,94
» 24 » — N° 5	2.000.000	1,06
» 48 » — N° 3	21.120.000	3,24
» 48 » — N° 4	12.360.000	1,53
» 48 » — N° 5	contamination par <i>B. subtilis</i>	

Nous constatons donc que si, d'une façon générale, la quantité de bacilles lactiques et d'acide lactique produits parallèlement sur bouillon de touraillon carbonaté, s'accroissent avec le temps, il ne semble pas y avoir proportionnalité entre la durée de l'expérience et la quantité de bacilles développés, pas plus qu'entre la quantité de bacilles et l'acide lactique produit; par exemple, à une quantité de bacilles lactiques à peine doublée peut correspondre une proportion d'acide lactique triplée.

Dans les cultures très prolongées, la production d'acide lactique se ralentit bientôt considérablement, tandis que le nombre de bacilles croît encore pour atteindre un maximum, puis décroît ultérieurement à la suite d'une lyse probable.

Le rapport de l'acide lactique produit au nombre de bacilles développés dans la culture, varie grandement d'une race de bacilles à l'autre.

Les cultures liquides de bacilles lactiques purs se montrent, dans la limite de nos expériences, très supérieures aux comprimés de ferments lactiques du commerce employés tels. Ceux-ci

peuvent d'ailleurs apporter, en outre des bacilles lactiques, des souillures ou sources de contamination.

*
* * *

Nous avons donc cru préférable, pour nos expériences, de nous adresser à la culture pure de bacilles lactiques (*Bacillus bulgaricus*) initialement étudiée, celle-ci ayant été obtenu à partir d'une bonne source pharmaceutique active.

Nous ne croyons pas inutile de rappeler ci-après, les caractères du bacille bulgare mis en œuvre, d'après MAHEU.

Morphologie. — Le *Bacillus bulgaricus* de GRIGOROFF est un très gros bacille de 2 à 20 μ en chaînes à plusieurs articles, ce qui lui donne l'aspect du bacille charbonneux. Immobile, dépourvu de capsule, il est indifféremment aérobie ou anaérobie. Dans les cultures de plusieurs jours, le protoplasma se condense au milieu de chaque article, ce qui donne à ce bacille, l'aspect de gros streptocoques. Pas de spores.

Dans les cultures, le *Bacillus bulgaricus* se présente en éléments bacillaires, courts, trapus, présentant de nombreuses formes d'involution. Parfois, le bacille se prolonge en une chaînette d'éléments courts, granuleux, ou bien ce sont de longues chaînettes de 15 à 20 éléments présentant tous les caractères des streptocoques ou mieux des streptodiplocoques, les articles ovoïdes étant souvent étranglés en leur milieu.

Coloration. — Prend le Gram.

Cultures. — Dans les milieux usuels, sa végétation est pauvre. Sur gélatine sucrée, pas de culture. Sur gélose : petites colonies d'un millimètre de diamètre, blanches, en lentilles épaisses et ombiliquées dans la zone anaérobie; dans la zone aérée, petits flocons givrés assez denses très caractéristiques. Sur gélose en plaques : petites colonies givrées, très petites, souvent ombiliquées. Sur bouillon, cultive très mal. Sur sérum peptonisé (à

1,5 % de peptone WITT ou CHAPOTEAUT), se conserve vivace même après le vingtième jour.

Sur lait, est coagulé en bloc vers la dix-huitième heure à 37°, le caillot n'est pas redissous, les graisses du lait sont altérées et saponifiées, ce qui donne un goût de suif désagréable caractéristique.

Peut être cultivé avec avantage sur sérum de lait, préparé ainsi : Faire bouillir le lait 5 minutes, ajouter au lait bouillant 1 cm³ d'acide chlorhydrique par litre; on sépare la caséine précipitée. Le sérum est alcalinisé, on ajoute 300 grammes d'eau, 3 grammes de gélatine, 15 grammes de sucre de canne pour un litre. Stériliser à 115°, filtrer et stériliser de nouveau après répartition. Culture abondante au 2^e jour, les bactéries se conservent vivantes plus d'une semaine à la température du laboratoire.

Pathogénéité. — Espèce inoffensive pour l'homme.

Pour avoir à notre disposition des quantités suffisantes de bacilles lactiques, nous avons dû cultiver largement ceux-ci sur 100 boîtes de bouillon de touraillon gélosé et carbonaté.

Nosensemencements furent réalisés avec 10 cm³ par boîte d'une suspension de bacilles prélevée sur bouillon de touraillon. Après 48 heures d'étuve à 37°, les bacilles développés ont été mis à nouveau en suspension dans le liquide initial et recueillis aseptiquement, puis incorporés à 6 kilogs de sucre en poudre.

Nous avons choisi, en effet, le saccharose comme support de notre préparation, de façon à pouvoir incorporer dans le régime d'étude ou d'essai, de larges proportions de bacilles sans modifier les conditions expérimentales, la ration utilisée étant elle-même à base de saccharose. Le lactose fut éliminé d'ailleurs du fait qu'introduit dans des rations synthétiques, il se comporte — comme l'ont montré Mme RANDOIN et LECOQ — différemment des autres glucides.

La masse sucrée humectée avec la suspension de bacilles lactiques fut ensuite granulée, puis séchée. Ensuite le nombre des

bacilles a été déterminé, comme précédemment, à la cellule de THOMA; il fut trouvé de cette manière 2 milliards 400 millions de bacilles lactiques par gramme de saccharose.

* *
* *

La technique choisie pour nos essais sur l'influence des bacilles lactiques dans l'évolution du rachitisme expérimental fut celle que LECOQ et VILLUIS avaient adoptée pour leurs travaux antérieurs.

Le régime RANDOIN-LECOQ (*Régime RL*) que nous avons utilisé, répond à la composition centésimale ci-après :

Peptone de viande	17
Levure de bière sèche pulvérisée	3
Graisse de beurre	5
Huile d'olive	5
Saccharose.....	65
Mélange salin Z 84	4
Lactate de calcium	1
Eau distillée et papier filtre ...	<i>ad libitum</i>

Le Mélange salin Z 84 se compose de :

Chlorure de potassium	85
Carbonate de sodium anhydre .	85
Carbonate de magnésium	28,6
Lactate de calcium	200
Citrate ferrique	10
Iodure de potassium	0,020
Sulfate de manganèse	0,078
Fluorure de sodium	0,240
Alun de potassium calciné	0,024

Ce régime nous a paru préférable aux régimes

D de PAPPENHEIMER, MC CANN et ZUCKER,

3.143 de MC COLLUM

et 2.695 de STEENBOCK

dans lesquels la présence de céréales ou de farine de céréales,

introduit un élément d'irrégularité dans les résultats, signalé d'ailleurs par MC COLLUM et ses collaborateurs, ainsi que par HOLMES et TRIPP.

Suivant les matières premières utilisées, la teneur en phosphore du régime *RL* peut varier, selon ALQUIER de 0,120 à 0,187%, la teneur en calcium oscillant elle-même de 0,420 à 0,450. Le rapport Ca/P est ainsi compris entre 2,3 et 3,75, sans que ces variations aient une influence sur les propriétés rachitigènes du régime.

Les jeunes rats blancs de 35 à 45 grammes recevant cette nourriture exclusive, contractent en 6 à 8 jours, un rachitisme typique essentiellement caractérisé à la radiographie par un élargissement des cartilages de prolifération de la tête du tibia et de l'humérus, dont la guérison peut être obtenue en dix jours, ainsi que nous le montrerons dans les chapitres suivants, par adjonction d'une proportion suffisante de vitamine antirachitique naturelle ou synthétique (ergostérol irradié) ou encore d'une source active de P^2O^5 .

L'action rachitigène rapide du régime RANDOIN-LECOQ et sa relative simplicité en constituent la supériorité vis-à-vis des autres régimes, dont les résultats plus lents sont aussi parfois assez inconstants pour la raison signalée plus haut. Cependant, tout en reconnaissant qu'il provoque chez les rats des symptômes rachitiques « d'une manière prompte et énergique », ROGOWSKI lui reproche d'agir défavorablement sur le développement et la croissance des animaux. Nous ne pouvons nous expliquer cette insuffisance d'action que par un manque de discernement dans le choix de la peptone, par exemple, ou plus vraisemblablement de la levure. L'auteur note, en effet, un taux de phosphore assez bas de 0,0806 p. 100 (le taux de calcium étant de 0,460 p. 100, par conséquent sensiblement normal), ce qui entraîne une élévation du rapport Ca/P .

Nous insistons sur la nécessité d'employer une peptone de

muscle provenant de viande non altérée, ainsi qu'une levure de bière riche en vitamines B₁, B₂ et B₃, laquelle n'offre toute garantie d'efficacité, que lorsqu'elle est récoltée — ainsi que l'ont montré Mme RANDOIN et LECOQ — sur moût de malt pur, puis séchée dans le vide à basse température. Ajoutons que si les animaux doivent être maintenus à l'obscurité, il convient d'éviter l'excès de chaleur et aussi, par dessus tout, le froid et l'humidité de l'atmosphère. L'humidité d'un local, chauffé cependant, peut être cause de sérieux déboires dans l'élevage des jeunes rats mis au régime RANDOIN-LECOQ.

Ces précautions étant prises, les rats accusent le plus souvent pendant les premiers jours, une perte de quelques grammes, due au changement brusque de nourriture, mais par la suite rapidement compensée. L'augmentation de poids de 12 gr. en 30 jours, notée par ROGOZINSKI, est nettement insuffisante; 20 à 30 grammes d'augmentation s'observent, même dans les cas les moins bons, le développement normal, chez les animaux bien suivis, étant de 40 à 50 grammes. Les observations récentes de Mme RANDOIN sont, sur ce point, en accord avec les nôtres.

Parallèlement, au régime RANDOIN-LECOQ type, nous avons préparé un autre régime dans lequel le saccharose pur était remplacé par la préparation de bacilles lactiques fixés sur saccharose et renfermant, ainsi que nous l'avons vu plus haut, environ 2 milliards 400 millions d'entre eux par gramme.

Les rats nous ont paru s'adapter moins facilement au régime rachitigène enrichi en bacilles lactiques, qu'au régime habituel : sept à dix jours sont le plus souvent nécessaires, avant que les animaux en expérience reprennent du poids. Ensuite, leur courbe de croissance reste légèrement au-dessous de celle des rats témoins, élevés dans les mêmes conditions, mais alimentés avec le régime rachitigène RL.

Nous avons, au cours de ces essais, déterminé tous les dix jours, le pH des fèces des animaux. Les crottes préalablement

délayées dans de l'eau bi-distillée dont la neutralité était rigoureusement vérifiée, étaient soumises à l'action des colorants usuels à savoir :

le pourpre de bromocrésol	variant de pH	5,2 à 6,6
le bleu de bromothymol	—	6,0 à 7,6
le rouge de crésol	—	7,2 à 8,8
le bleu de thymol alcalin	—	8,0 à 9,6

puis examinées avec l'appareil de HELLIGE, dont les colorations témoins sont une excellente base de comparaison.

Les moyennes des résultats obtenus sont consignées ci-après :

	Régime RL.	Régime RL avec bac. lactiques.
pH fécal, au dixième jour.....	7,5	7,4
— au vingtième jour	8,2	7,5
— au trentième jour	8,3	7,7
Augmentation moyenne de poids au trentième jour	42 gr.	30 gr.

Le pH fécal ne présente, ainsi qu'on peut s'en rendre compte, sous l'influence des bacilles lactiques, qu'une évolution ralentie vers l'alcalinité.

L'expérience étant prolongée, le pH fécal des rats recevant les bacilles lactiques atteint en moyenne 7,9 au quarantième jour et 8,1 au cinquantième jour. Il faut donc environ cinquante jours pour observer en présence de bacilles lactiques, ce qu'on observe en vingt jours, en leur absence. Cette acidification réelle mais faible du milieu intestinal n'empêche d'ailleurs pas l'apparition d'un rachitisme normal, dans les délais habituels, que révèlent les radiographies faites concurremment aux déterminations du pH. La tendance à la calcification n'est pas plus grande en présence des bacilles.

La réaction du milieu intestinal ne joue d'ailleurs pas un rôle absolu dans la production du rachitisme. SHELLING a montré, en particulier, que des rations productrices d'acides peuvent

provoquer un rachitisme plus sévère que des rations alcalines. Inversement, LECOQ et VILLETTE ont observé avec les rations non rachitigènes 86 et 97, qui permettent une bonne croissance et une calcification osseuse satisfaisante des rats, un pH fécal nettement alcalin, plus alcalin même que celui obtenu avec le régime rachitigène RANDOIN-LECOQ.

La composition centésimale des régimes 86 et 97 est donnée ci-dessous :

	Régime 86	Régime 97
Caséine purifiée	6	»
Fibrine purifiée	6	»
Ovalbumine purifiée	6	»
Peptone de viande	»	17
Levure de bière sèche	5	3
Graisse de beurre	4	7
Huile d'olive	»	2
Saccharose.....	67	65
Mélange salin d'Osborne et Mendel.	4	4
Agar-agar pulvérisé.....	2	2
Eau distillée et papier filtre	<i>ad libitum</i>	<i>ad libitum</i>

ainsi que le pH fécal et la croissance moyenne des animaux :

	Régime 86	Régime 97
pH fécal au trentième jour	8,8 à 9,2	8,8 à 9,2
Augmentation moyenne du poids initial au trentième jour	67 gr.	65 gr.

Un pH intestinal alcalin n'apparaît donc pas nécessairement producteur de rachitisme chez le rat, lorsque le régime est rationnellement composé. De même, une acidification du tractus digestif, surtout si elle reste légère comme dans le cas de l'ingestion quotidienne de bacilles lactiques, n'entraîne pas obligatoirement la guérison des lésions rachitiques osseuses, quand le régime rachitigène continue d'être administré.

*
* *

On sait que le lactose est un milieu de choix pour la culture du bacille lactique. Si, par exemple, on ensemence de la poudre

de lactose additionnée d'une petite quantité de carbonate de chaux et stérilisée, avec une suspension de ferments lactiques, on observe très rapidement une abondante prolifération microbienne. Cette technique, qui est à la base de la préparation de l'acide lactique de fermentation permet inversement d'obtenir une abondante production de bacilles lactiques.

On pouvait donc se demander si le lactose introduit dans le milieu intestinal se montrerait plus apte que les bacilles lactiques eux-mêmes à produire une acidification susceptible d'exercer une action favorable sur la calcification des animaux rachitiques.

Les essais de KLINE, KEANAN, ELVEHJEM et HART permettaient de le penser. Ces auteurs produisent en effet, un rachitisme typique chez le poulet, à l'aide d'une ration composée de :

Maïs jaune	58
Remoulages de blé	25
Caséine.....	12
Levure sèche	2
Chlorure de sodium	1
Carbonate de calcium	2

et ce rachitisme cède à l'adjonction de 40 p. 100 de lactose, en même temps que le pH intestinal qui était initialement de 6,8 à 7,1 passe de 6,1 à 6,6.

Afin d'apprécier cette action particulière du lactose, nous l'avons introduit dans le régime RANDOIN-LECOQ, en remplacement du saccharose et à dose égale. Les rats recevant cette nouvelle ration présentèrent une chute rapide de poids atteignant 1/5 à 1/3 du poids initial et, selon l'importance de celui-ci, moururent du cinquième au quinzième jour de l'expérience.

Certes, le pH fécal des rats s'acidifiait sous l'influence du régime au lactose plus nettement encore que par l'ingestion de bacilles lactiques (nous l'avons trouvé de 6,8 à 6,9); mais des variations analogues du pH ont été signalées chez le rat par OSER, sous l'influence de l'inanition,

Les sujets préalablement rachitisés au moyen du régime RL et qui subissent ensuite le régime au lactose, présentent — du moins s'ils vivent assez longtemps — une calcification; mais celle-ci est due à l'inanition provoquée par l'action déséquilibrante du lactose. Mme RANDOIN et LECOQ, puis LECOQ, ont montré en effet qu'un régime contenant une forte proportion de lactose (66 %) ne permet pas d'assurer la vie du pigeon, même quand il est absorbé en quantité énergétiquement suffisante et complété par une large proportion de levure, bonne source de vitamines B. La quantité de levure donnée quotidiennement peut atteindre 4 grammes, sans produire aucune action de complément, alors qu'une dose de 0 gr. 50 de levure suffit très largement quand une autre source de glucides entre dans la ration. Des phénomènes du même ordre furent observés ultérieurement par LECOQ, chez le rat. Un déséquilibre du même ordre fut obtenu par LECOQ et SAVARE avec l'huile de ricin.

Introduit dans le tube digestif, le lactose intervient bien comme modificateur de la flore intestinale, mais il conserve son action déséquilibrante avec laquelle il importe de compter.

* * *

Poursuivant nos recherches sur les modifications de la flore intestinale accompagnant les modifications ioniques des fèces, nous avons systématiquement, pendant deux mois environ, examiné du point de vue bactériologique, les fèces des rats soumis au régime rachitigène additionné ou non de bacilles lactiques et complété ou non par une source active de vitamine D ajoutée en quantité suffisante.

Vouloir déterminer avec exactitude l'ensemble des microbes présents dans cette flore, dépasserait largement le cadre de notre travail, aussi n'avons-nous fait qu'effleurer le sujet.

L'examen direct des fèces des jeunes rats blancs, au régime varié a permis de décéler des bactéries à Gram positif et des bactéries à Gram négatif en nombre sensiblement égal.

Parmi les bactéries à Gram négatif, les coliformes dominent; parmi les bactéries à Gram positif, on note des bacilles avec des éléments sporulés, genre *B. perfringens*, des bâtonnets grêles rappelant les bacilles lactiques et des entérocoques.

Quel que soit le jour, on trouve pratiquement les mêmes espèces, avec quelquefois des spirochètes.

Chez les rats soumis au régime rachitigène RL l'examen des fèces a donné les mêmes résultats, sans que l'on puisse trouver une espèce dominante. L'addition d'ergostérol irradié n'amène aucun changement.

* *
* *

En conclusion, les bacilles lactiques de même que le lactose introduits dans le régime rachitigène apparaissent comme une cause de modification du milieu intestinal, sans toutefois que l'acidification produite entraîne parallèlement la guérison du rachitisme.

CHAPITRE III

INFLUENCE DE QUELQUES COMPOSÉS INORGANIQUES DU PHOSPHORE SUR L'ÉVOLUTION DU RACHITISME EXPÉRIMENTAL.

Nous avons vu, au cours des chapitres précédents que, le plus souvent, sous l'influence du régime rachitigène, se développe dans le tractus intestinal, une réaction à tendance alcaline. Une modification du milieu dans le sens acide peut être obtenue, par l'introduction dans la ration de bacilles lactiques ou de lactose. Mais, contrairement à ce que l'on pourrait penser, cette modification de la réaction ne suffit pas à prévenir le rachitisme, du moins en ce qui concerne le rachitisme expérimental.

Comme cette maladie est provoquée, chez le rat, au moyen de rations comportant habituellement et spécialement dans le cas du régime RANDOIN-LECOQ, à la fois un déséquilibre phosphocalcique et l'absence de vitamine D, il apparaît possible d'obtenir, de deux manières, la guérison des animaux, par suppression du déséquilibre phosphocalcique, ou par addition d'une source de vitamine D.

Le régime RANDOIN-LECOQ comportant un large excès de calcium, c'est seulement par une addition opportune de phosphore que le rapport phosphocalcique pourra être ramené à un plus juste équilibre. Ce rapport exprimé par $\frac{Ca}{P}$ peut varier comme nous l'avons vu, selon les matières premières mises en œuvre, de 2,3 à 3,75. Or, il devrait être égal normalement, si nous en croyons

SHOHL, BENNETT et WEED, à 1,33. Hâtons-nous de dire que ce chiffre n'est qu'indicatif et ne saurait être considéré comme absolu car les travaux de LECOQ et VILLUIS ont déjà amplement démontré que les sources officinales de phosphore sont de valeur antirachitique très inégale. Ces auteurs ont établi, notamment :

1^o Que les phosphates l'emportent de beaucoup en activité antirachitique sur les phosphures et les hypophosphites, qui pratiquement sont sans effet ;

2^o Que l'action des différents phosphates de calcium (mono-, bi- et tricalcique) ne se montre pas proportionnelle au phosphore fourni, mais apparaît sous la dépendance des fonctions acides non saturées, lesquelles viennent renforcer la valeur propre du groupe phosphatique ;

3^o Que l'acide phosphorique libre, en conformité avec le fait précédent, l'emporte en activité sur les sels, spécialement les phosphates disodique, mono-, bi- et tricalcique.

Nous nous sommes proposé de compléter ces recherches, très largement en dehors du cadre de la pharmacopée française. Nous en exposerons ici l'ensemble des résultats, en appuyant sur les faits particuliers que nous avons pu mettre en évidence, avec la précieuse collaboration de notre maître et ami, Raoul LECOQ.

* * *

La technique adoptée pour ces recherches fut strictement celle choisie par LECOQ et VILLUIS dans leurs travaux antérieurs.

Des jeunes rats blancs, de 21 jours environ, pesant de 35 à 45 grammes sont maintenus dans des cages métalliques, à l'abri de la lumière et reçoivent comme nourriture exclusive le régime rachitigène RL (voir Chapitre II) ; l'eau distillée et le papier filtre (servant d'aliment encombrant et de litière) sont donnés en outre *ad libitum*. Le fond de la cage comporte des mailles suffi-

samment larges pour laisser passer les déjections, recueillies sur un double fond de tôle galvanisée.

La ration du régime RL est de 15 grammes environ par jour et par rat, donnée de préférence en deux fois dans la journée dans des mangeoires métalliques bien propres. Pratiquement, les animaux en consomment entre 10 et 12 grammes.

Il se développe dans ces conditions, en 6 à 8 jours un rachitisme typique, caractérisé à la radiographie par un élargissement des épiphyses des os longs, spécialement du tibia et de l'humérus. Cet élargissement, de même que l'apparition d'un double chapelet chondro-costal, est d'ailleurs perceptible à la main, avec un peu d'habitude.

Des lots de 4 rats sont normalement constitués pour chacune des expériences. Après contrôle radiographique effectué, dans les conditions précisées par VILLUIS, les rats reçoivent alors la même ration additionnée de proportions définies de la substance à examiner; par exemple 0,50-0,75-1-1,50-2 et 3%. Une nouvelle radiographie est faite après 10 jours de traitement, afin d'apprécier la calcification produite. S'il y a lieu, les animaux sont tués et autopsiés. Des examens macroscopiques et microscopiques permettent de se rendre un compte exact des modifications osseuses.

* * *

Passons maintenant en revue les principaux composés inorganiques dérivés du phosphore. Ceux-ci peuvent être dépourvus d'oxygène, comme les phosphures; les plus nombreux sont, au contraire, oxygénés. Ces derniers dérivent principalement des anhydrides hypophosphoreux P^2O , phosphoreux P^2O^3 et phosphorique P^2O^5 .

Par fixation d'eau, l'anhydride hypophosphoreux donne l'acide hypophosphoreux PO^2H^3 dont les sels sont les hypophosphites; l'anhydride phosphoreux, donne l'acide phospho-

reux PO^3H^3 dont les sels sont les phosphites; enfin, l'anhydride phosphorique donne par fixation d'une, deux ou trois molécules d'eau, trois acides différents :

L'acide métaphosphorique : PO^3H



L'acide pyrophosphorique : $\text{P}^2\text{O}^7\text{H}^4$



L'acide orthophosphorique ou acide phosphorique officinal :



Ces acides fournissent les métaphosphates, pyrophosphates et orthophosphates ou phosphates ordinaires.

* * *

De tous les phosphures qu'il serait possible de préparer, on n'utilise pratiquement que le phosphure de zinc.

Le *phosphure de zinc* correspond à la formule P^2Zn^3 et son poids moléculaire est 257. Il contient 24,12 % de phosphore. Inscrit au Codex de 1908, il se prépare en traitant le zinc pur par des vapeurs de phosphore. La technique suivante est décrite par LEBEAU et COURTOIS :

On place dans un tube deux nacelles de porcelaine, l'une contenant du zinc et l'autre du phosphore. Le tube est relié de ses deux extrémités à un ballon à deux tubulures et l'ensemble est traversé par un courant d'hydrogène que l'on peut inverser et qui agit comme gaz inerte. On chauffe le tube, les vapeurs de phosphore attaquent le zinc fondu, qui se recouvre d'une couche de petits cristaux. Le phosphore qui n'a pas réagi, se condense dans l'un des ballons. On chauffe ce ballon et on fait passer le courant d'hydrogène en sens inverse, de manière à entraîner de nouveau la vapeur de phosphore et à compléter la réaction. On

ouvre l'appareil à froid de façon à éviter l'inflammation du phosphore et on en extrait le phosphure de zinc qui est constitué par des prismes droits pouvant atteindre 1 et 2 centimètres de longueur.

L'expérimentation de ce sel fut faite par LECOQ et VILLUIS, dont nous reproduisons les conclusions. L'addition de 0 gr. 10 p. 100 de phosphure de zinc au régime RL suffit à provoquer la mort des animaux en 3 à 5 jours avec parfois une assez importante chute de poids pour entraîner une calcification osseuse anormale analogue à celle qui est causée par l'inanition. Par contre, l'addition à la ration de 0,05 p. 100 de ce phosphure, mieux supportée par le jeune rat, n'est suivie d'aucune modification des lésions rachitiques.

Aux doses où il peut être toléré par l'organisme du rat, le phosphure de zinc se montre donc dépourvu de propriétés anti-rachitiques.

* * *

Les hypophosphites, moins dangereux que les phosphures sont plus fréquemment utilisés. Citons, parmi ces derniers, l'hypophosphite de sodium et l'hypophosphite de calcium, tous deux inscrits au Codex de 1908.

L'*hypophosphite de sodium* a pour formule $\text{PO}^2\text{H}^2\text{Na}$ et pour poids moléculaire 188, il contient 32,20 % de phosphore; on le prépare par saturation d'une solution d'acide hypophosphoreux avec du carbonate de sodium, ou par double décomposition entre les solutions d'hypophosphite de chaux et de carbonate de sodium. La solution d'hypophosphite concentrée à une température inférieure à 50°, abandonne des cristaux incolores, de saveur amère et nauséuse.

L'*hypophosphite de calcium* a pour formule $(\text{PO}^2\text{H}^2)^2\text{Ca}$ et pour poids moléculaire 170. Il contient 36,47 % de phosphore. On l'obtient en faisant bouillir du phosphore avec un lait de

chaux, jusqu'à cessation de dégagement de phosphure d'hydrogène. L'excès de chaux est précipité par un courant de gaz carbonique. Le filtrat, concentré à basse température, abandonne des cristaux blancs, brillants, inaltérables à l'air, d'une saveur amère et désagréable.

L'expérimentation des hypophosphites de sodium et de calcium qui fut faite par LECOQ et VILLUIS a montré que des additions s'échelonnant de 0,50 à 3 % de ration rachitigène, sont totalement inactives.

Les phosphites qui voisinent avec les hypophosphites sont, il faut bien l'avouer, assez peu employés. Le phosphite de gaïacol toutefois, préparation organique, reste encore préconisé en thérapeutique. Entendant demeurer dans le champ des sels inorganiques, nous nous sommes adressé au phosphite de sodium.

Le *phosphite de sodium* répond à la formule $\text{PO}^2\text{Na}^2\text{H}_5\text{OH}^2$. Son poids moléculaire est 216. Il renferme 14,35 % de phosphore et peut être obtenu en ajoutant du carbonate de sodium à une solution d'acide phosphoreux. Il se présente en cristaux incolores, inodores et de saveur légèrement salée.

Ce phosphite ajouté aux doses de 0,50-0,75-1-1,50-2 et 3 % du régime RL, s'est montré, lui aussi, dépourvu de toute action antirachitique. Les résultats précédents obtenus tant sur les hypophosphites que sur le phosphite de sodium peuvent par conséquent être résumés dans le tableau ci-dessous (1) :

Sel ajouté au régime rachitigène RL.	Proportions pour 100					
	0,50	0,75	1	1,50	2	3
Hypophosphite de sodium	—	—	—	—	—	—
Hypophosphite de calcium	—	—	—	—	—	—
Phosphite de sodium	—	—	—	—	—	—

(1) Le signe — indique une absence ou une insuffisance de calcification.

La théorie suivant laquelle les hypophosphites et phosphites, formes sous-oxydées du phosphore, seraient les seules actives, n'apparaît donc pas justifiée.

Il semble que les groupes P^2O et P^2O^3 qui se trouvent à l'origine des hypophosphites et des phosphites soient dépourvus pratiquement d'action sur la calcification osseuse des animaux rendus expérimentalement rachitiques.

* * *

Il nous a semblé intéressant de rapprocher et de confronter l'action des différents phosphates : méta-, pyro- et orthophosphates de sodium. Nous y avons joint les orthophosphates mono- et bipotassique, ainsi que les orthophosphates mono- et diammonique.

Le *métaphosphate de sodium* répond à la formule PO^3Na ; son poids moléculaire est 102. Il renferme 30,39 % de phosphore, coagule l'albumine en milieu acide et précipite en blanc l'azotate d'argent et le chlorure de baryum. Il peut être obtenu par calcination au rouge d'un mélange d'orthophosphates de sodium et d'ammonium. Il se présente sous l'aspect d'un sel fondu en plaques transparentes, de cassure nette. Sa saveur est brûlante.

Le *pyrophosphate de sodium* répond à la formule $P^2O^7Na^4$, 10 OH^2 ; son poids moléculaire est 446. Il renferme 13,90 % de phosphore, ne coagule pas d'albumine et ne précipite que très incomplètement le chlorure de baryum et l'azotate d'argent. Il est obtenu par calcination au rouge de l'orthophosphate disodique, et se présente après cristallisation en fins cristaux insipides.

Le *phosphate diacide de sodium* ou *orthophosphate monosodique* répond à la formule PO^4H^2Na , 2 OH^2 ; son poids moléculaire est 156. Il renferme 19,87 % de phosphore. La teneur en eau de ce sel paraît, suivant les ouvrages consultés, très variable.

Tandis que certains lui attribuent une molécule d'eau de cristallisation, la pharmacopée anglaise note qu'il doit titrer au moins 70 % de sel anhydre, ce qui correspond à une proportion d'eau très supérieure. Le sel que nous avons examiné renfermait d'ailleurs 2 molécules d'eau. Ce phosphate peut être obtenu par saturation ménagée de l'acide phosphorique à l'aide du carbonate de sodium. Il se présente en cristaux incolores ou en poudre cristalline, très soluble dans l'eau, de saveur saline et acide peu prononcée.

Le *phosphate mono-acide de sodium* ou *orthophosphate disodique* répond à la formule $\text{PO}^4\text{Na}^2, 12 \text{ OH}^2$ et a pour poids moléculaire 358; il contient 8,66 % de phosphore. On le prépare à partir du phosphate tricalcique contenu dans la cendre d'os que l'on transforme initialement en phosphate monocalcique par action de l'acide sulfurique, puis en chauffant le phosphate monocalcique avec du carbonate de sodium. On peut aussi l'obtenir en saturant, en présence de phtaléine, l'acide phosphorique par le carbonate de sodium. Formé de prismes rhomboïdaux obliques, incolores, le phosphate disodique est de saveur fraîche, légèrement salée et très efflorescent.

Le *phosphate neutre de sodium* ou *orthophosphate trisodique* répond à la formule $\text{PO}^4\text{Na}^3, 12 \text{ OH}^2$. Il a pour poids moléculaire 380 et renferme 8,15 % de phosphore. Il est obtenu par saturation complète de l'acide orthophosphorique au moyen de carbonate de sodium; il se présente en fins cristaux blancs, de saveur légèrement salée.

Le *phosphate di-acide de potassium* ou *orthophosphate monopotassique* a pour formule $\text{PO}^4\text{H}^2\text{K}$ et pour poids moléculaire 136. Il renferme 22,79 % de phosphore et se prépare de façon analogue au phosphate monosodique. Les cristaux, assez volumineux, sont de saveur à la fois acide et saline.

Le *phosphate mono-acide de potassium* ou *orthophosphate bipotassique* répond à la formule PO^4HK^2 ; il a pour poids molé-

culaire 174 et renferme 17,81 % de phosphore. Il se prépare comme le phosphate disodique et se présente en fins cristaux blanchâtres de saveur salée.

Le *phosphate acide d'ammonium* ou *orthophosphate mono-ammonique* répond à la formule $\text{PO}^4\text{H}^2\text{NH}^4$. De poids moléculaire 115, il renferme 26,95 % de phosphore et se prépare de façon identique au phosphate monosodique. Il se présente en cristaux transparents prismatiques, de saveur salée et acide.

Le *phosphate dit neutre d'ammoniaque* ou *orthophosphate biammonique* répond à la formule $\text{PO}^4\text{H}(\text{NH}^4)^2$. Son poids moléculaire est égal à 132 et il renferme 23,48 % de phosphore. Il se prépare de façon analogue au phosphate disodique et se présente sous la forme d'une poudre cristalline blanche salée, légèrement ammoniacale.

L'action curative de ces sels a été essayée comme d'ordinaire aux doses de 0,50-0,75-1-1,50-2 et 3 % de la ration rachitigène. Les résultats sont brièvement résumés par le tableau ci-après (1) :

Sel ajouté au régime rachitigène RL.	Proportions pour 100					
	0,50	0,75	1	1,50	2	3
Métaphosphate de sodium	—	—	+	+	+	+
Pyrophosphate de sodium	—	—	—	+	+	+
Orthophosphate monosodique.	+	+	+	+	+	+
» disodique.	—	—	—	+	+	+
» trisodique	—	—	—	—	+	+
» monopotassique	+	+	+	+	+	+
» bipotassique.	—	+	+	+	+	+
» monoammonique	+	+	+	+	+	+
» biammonique	+	+	+	+	+	+

(1) Le signe + indique une bonne calcification et le signe — une absence ou une insuffisance de calcification.

Comme on le voit, le métaphosphate et le pyrophosphate de sodium commencent à exercer une action antirachitique manifeste aux doses respectives de 1 et 1,50 correspondant à une addition d'environ 0,300 et 0,200 de phosphore p. 100 de la ration.

En ce qui concerne les orthophosphates mono-, di- et trisodique, les doses utiles à la calcification sont respectivement voisines de 0,50 — 1,50 et 2 p. 100, les doses actives minima étant sensiblement 0,45 — 1,17 et 1,75 p. 100, lesquelles correspondent à une addition de 0,090-0,100 et 0,140 de phosphore p. 100 de la ration. La dose d'acide orthophosphorique pur nécessaire pour produire une même calcification est comme on sait, de 0 gr. 50 p. 100 correspondant à 0,080 P.

Tenant compte de ce fait, que le phosphate disodique est, parmi les orthophosphates, le plus proche du pyrophosphate neutre de sodium, chaque groupe P^2O^5 se trouvant (dans l'un et l'autre cas) lié à $2Na$; nous aboutissons au schéma ci-après particulièrement suggestif.

Sel	Dérivé de :	Dose active
Métaphosphate de sodium .	P^2O^5 + une molécule d'eau	0,300 P
Pyrophosphate de sodium .	P^2O^5 + deux »	0,200 P
Orthophosphate disodique .	P^2O^5 + trois »	0,100 P

L'activité antirachitique de ces sels s'avère donc en rapport direct avec le nombre de molécules d'eau fixées par P^2O^5 , pour donner les acides dont ils dérivent, et les doses actives, en rapport inverse.

Les orthophosphates mono- et bipotassique assurent la calcification aux doses respectives de 0,50 et 0,75 p. 100, les doses actives minima étant proches de 0,40 et 0,57 p. 100, lesquelles correspondent à une addition de 0,090 et 0,100 de phosphore pour 100 de la ration. Les orthophosphates mono- et bipo-

tassique se montrent donc d'efficacité égale à celle des orthophosphates mono- et disodique, par rapport à leur teneur en phosphore.

Les orthophosphates mono- et biammonique qui assurent, l'un comme l'autre, une calcification satisfaisante à la dose de 0,50 p. 100 de la ration, sont, à vrai dire, un peu moins actifs que les sels sodiques ou potassiques correspondants, les doses minima de calcification étant approximativement de 0,38 et 0,50, correspondent, en effet, à une addition de 0,100 et de 0,115 de phosphore p. 100 de ration.

*
* *

Poursuivant cette étude, nous nous sommes proposés de mettre en évidence l'action « antifixatrice du calcium », exercée par quelques métaux sous forme de carbonate. On sait, en effet, que l'incorporation dans le régime rachitigène de 2 % de strontium, de magnésium ou même de calcium aggravent les manifestations rachitiques du rat, ainsi que SHIPLEY, PARK, MC COLUM et SIMMONDS l'ont montré. MOURIQUAND, LEULIER et Mlle WEILL considèrent le rachitisme produit dans ces conditions, comme superposable au rachitisme « hypotrophique » des nourrissons. La décalcification se manifeste ici jusqu'en l'absence de croissance et confère aux animaux une sorte de résistance aux agents habituels de calcification. Des doses normalement suffisantes d'huile de foie de morue, d'ergostérol irradié ou de phosphate disodique se montrent sans activité.

Nous avons cru intéressant de reprendre cette étude, en utilisant le régime RANDOIN-LECOQ plus synthétique que les régimes employés par les auteurs précédents. Et, systématiquement, nous l'avons étendue à quelques autres métaux : fer, manganèse et bismuth.

A cet effet, nous avons eu recours, comme de coutume, à de

jeunes rats blancs de 35 à 45 grammes initialement rachitisés, en 6-8 jours, au moyen du régime RANDOIN-LECOQ. Ces rats furent ensuite soumis, pendant 10 jours à l'action curative du même régime, plus ou moins corrigé dans son déséquilibre phospho-calcique, par addition — selon les lots — à 100 grammes de ration, de 0 gramme; 0 gr. 80; 1 gr. 17; 1 gr. 50 et 2 grammes de phosphate disodique cristallisé (doses correspondant respectivement comme on sait, à 0,70; 100; 130 et 170 mgr. de phosphore),

D'autres séries furent établies de même manière, lesquelles reçurent en outre, dans tous les lots, 2 p. 100 de l'un ou l'autre des carbonates essayés, ceux-ci étant : le carbonate de calcium précipité, CO^3Ca ; le carbonate basique de magnésium, $3 \text{CO}^3\text{Mg}$, $(\text{OH})^2\text{Mg}$, 3OH^2 ; le carbonate de strontium, CO^3Sr ; le carbonate ferreux, spécialement préparé et desséché en présence de saccharose, en évitant les causes d'oxydation; le carbonate manganéux, CO^3Mn , OH^2 ; et le carbonate basique de bismuth $(\text{CO}^3\text{Bi}^2\text{O}^2)^2$, OH^2 .

Les résultats obtenus, contrôlés par la radiographie et l'autopsie des animaux, sont brièvement résumés dans le tableau suivant :

Carbonate ajouté dans la proportion de 2 pour 100	Doses de phosphate disodique ajoutées à 100 gr. de régime rachitigène RANDOIN-LECOQ				
	0 gr.	0 gr. 80	1 gr. 17	1 gr. 50	2 gr
Néant	—	—	+	+	+
Calcium	—	—	—	—	+
Magnésium	—	—	—	—	—
Strontium.	—	—	—	—	—
Fer	—	—	—	—	—
Manganèse.	—	—	—	—	—
Bismuth	—	—	—	+	+

La calcification qui s'observe dans le cas du témoin pour une addition de 1 gr. 17 de phosphate disodique (dose normale)

est manifestement retardée dans le cas des carbonates de bismuth et de calcium; mais elle l'est davantage encore quand les carbonates de magnésium, de strontium, de fer ou de manganèse sont ajoutés.

* * *

Une nouvelle série d'expériences fût faite en utilisant quelques phosphates de ces mêmes métaux choisis parmi les plus typiques. Nous en donnons la liste ci-après, en rappelant leurs caractères principaux.

Le *phosphate de magnésium* répond à la formule $\text{PO}^4\text{MgH}, 3 \text{ OH}^2$; son poids moléculaire est 173. Il renferme 17,81 % de phosphore et est obtenu en saturant une solution d'acide phosphorique par de la magnésie; on filtre et on évapore à siccité. Il se présente sous la forme d'une poudre blanche, de saveur faible.

Le *phosphate de strontium* a pour formule $(\text{PO}^4)^2\text{Sr}^3$; son poids moléculaire est égal à 277,5. Il renferme 13,70 % de phosphore et est obtenu par saturation d'acide phosphorique au moyen de la strontiane; il se présente sous l'aspect d'une poudre blanche de saveur peu agréable.

Le *phosphate mono-acide de calcium* ou *phosphate bicalcique* a pour formule $\text{PO}^4\text{H Ca}, 2\text{OH}^2$ et pour poids moléculaire 172; il renferme 18,02 % de phosphore. Sa préparation inscrite au Codex de 1884, consiste à précipiter une solution de chlorure de calcium par du phosphate disodique en milieu légèrement acide. Le précipité est lavé par décantation, jusqu'à ce que les eaux de lavage soient privées de chlorure de sodium. Préparé à froid, le sel officinal se présente en petits cristaux incolores, de saveur faible.

Le *phosphate neutre de calcium* ou *phosphate tricalcique* a pour formule $(\text{PO}^4)^2 \text{Ca}^3$. Son poids moléculaire est égal à 310; il contient 20 % de phosphore. Inscrit au Codex de 1908, il est

obtenu par double décomposition entre le chlorure de calcium et le phosphate disodique, en présence d'ammoniaque. Le Codex de 1884 donnait un procédé de préparation à partir des cendres d'os. On attaquait ces cendres par l'acide chlorhydrique officinal qui décomposait le carbonate de calcium des os avec dégagement de gaz carbonique et formation de chlorure de calcium passant en solution avec le phosphate tricalcique. On précipitait alors celui-ci par neutralisation de la solution au moyen de l'ammoniaque. Ce sel se présente sous la forme d'une poudre blanche, microcristalline, pratiquement insoluble dans l'eau.

Le *phosphate ferrique* répond à la formule PO^4Fe , 4OH^2 ; son poids moléculaire est égal à 223. Il renferme 13,9 % de phosphore et s'obtient par précipitation d'une solution de chlorure ferrique au moyen de phosphate de sodium. Le produit ainsi préparé, se présente sous la forme d'une poudre blanc verdâtre; il est de saveur ferrique peu prononcée.

Le *protophosphate de fer* ou *phosphate ferrosoferrique* répond à la formule $(\text{PO}^4)^2\text{Fe}^3$; son poids moléculaire est de 358; il renferme 17,32 % de phosphore. On le prépare en exposant à l'air le phosphate ferreux récemment obtenu en mélangeant une solution de sulfate de fer avec une solution de sulfate de sodium. D'abord blanc et gélatineux, le précipité prend une teinte gris-bleuâtre et une apparence pulvérulente. On lave, puis recueille le dépôt qu'on fait sécher à l'air. Le protophosphate de fer ainsi obtenu est une poudre amorphe, d'un bleu ardoise foncé, de saveur faible.

Le *phosphate de manganèse* répond à la formule $(\text{PO}^4)^2\text{Mn}^3$; son poids moléculaire est 355. Il renferme 17,46 % de phosphore. On l'obtient par double décomposition entre le sulfate de manganèse et le phosphate de sodium. Lavé, puis séché, il a l'aspect d'une poudre blanche, légèrement rosée, de saveur plutôt désagréable.

Le *phosphate de bismuth* a pour formule PO^4Bi et pour poids

moléculaire 303. Il renferme 10,23 % de phosphore. On l'obtient en précipitant une solution de phosphate disodique par du nitrate de bismuth dissous dans un excès d'acide phosphorique. C'est une poudre blanche à saveur légère de bismuth.

Selon la technique usuelle, des lots d'animaux reçurent, à titre curatif, des rations dans lesquelles entraient des doses de 0,50; 0,75; 1; 1,50, 2 ou 3 du sel étudié p. 100 de régime rachitigène RL. Dix jours plus tard, les rats étaient examinés, radiographiés à nouveau, puis autopsiés.

Les résultats obtenus peuvent être schématisés dans le tableau suivant :

Sel ajouté au régime rachitigène RL.	Proportions pour 100					
	0,50	0,75	1	1,50	2	3
Phosphate de magnésium	—	+	+	+	+	+
Phosphate de strontium.	—	+	+	+	+	+
Phosphate bicalcique	—	—	—	—	+	+
Phosphate tricalcique	—	—	—	—	—	+
Phosphate ferrique	—	—	—	—	—	—
Protophosphate de fer	—	—	—	—	—	—
Phosphate de manganèse	—	—	—	—	—	—
Phosphate de bismuth	—	—	—	—	—	—

Les phosphates de magnésium et de strontium furent trouvés actifs à la dose de 0,75 p. 100 gr. de ration; mais le phosphate de magnésium l'était encore à la dose de 0,57, correspondant à 0,100 de phosphore p. 100 (0,75 de phosphate de strontium apporte d'ailleurs cette même proportion de phosphore). Magnésium et strontium n'empêchent donc pas, dans les conditions de l'expérience, l'action antirachitique du groupe P^2O^5 de se manifester. Cette action se montra très comparable à celle du phosphate disodique. Ajoutons qu'aux doses plus élevées, voi-

sines de 2 et 3 %, l'action calcifiante des phosphates de magnésium et de strontium est déjà plus ou moins perturbée, souvent anormale ou irrégulière, du fait d'un apport plus grand des métaux « antifixateurs de calcium » qu'ils renferment.

Précisant les données antérieures de LECOQ et VILLUIS, nous avons trouvé que le phosphate bicalcique exerçait encore une calcification satisfaisante à la dose de 1,55 et le tricalcique à la dose de 2,50 % de ration, quantités correspondant à 0,280 et 0,500 de phosphore p. 100.

Par contre, jusqu'aux doses extrêmes de 3 %, les phosphates de fer, de manganèse et de bismuth, se montrèrent dépourvus de toute activité antirachitique.

*
* * *

En conclusion, les groupes hypophosphoreux P^2O et P^2O^3 apparaissent sans activité antirachitique. Le groupe phosphorique P^2O^5 , au contraire, présente une efficacité très nette sur la calcification des animaux préalablement rachitisés et celle-ci est en rapport avec le nombre des molécules d'eau fixées sur le radical, s'accroissant des métaphosphates, aux pyrophosphates et aux orthophosphates. Certains métaux, spécialement le fer, le manganèse et le bismuth inhibent ou retardent l'activité propre du radical phosphoré dans lequel ils se trouvent engagés. D'autres, comme le strontium, le magnésium et le calcium, ajoutés sous forme de carbonates agissent également comme antifixateurs de calcium.

CHAPITRE IV

COMPARAISON DE L'ACTIVITÉ ANTIRACHITIQUE DE L'ERGOSTÉROL IRRADIÉ ET DES COMPOSÉS PHOSPHORÉS.

Ainsi que nous le rappelions dans le chapitre précédent, il est possible d'obtenir la guérison du rachitisme expérimental obtenu par ingestion exclusive d'un régime approprié, par suppression du déséquilibre phosphocalcique ou par addition d'une source de vitamine D.

La vitamine D se trouve, comme on le sait, à l'état naturel dans l'huile extraite du foie de la morue et de certains poissons, notamment le requin, la lotte, la raie, etc. Elle peut également être synthétisée par irradiation ultraviolette d'une solution d'ergostérol. L'ergostérol, isolé pour la première fois par TANRET, à partir de l'ergot de seigle, est en effet considéré comme la *provitamine D*.

Activé par irradiation ultraviolette, l'ergostérol constitue une bonne source de vitamine D, qu'il est possible de conserver longtemps sans altération en solution dans l'huile d'olive, à condition toutefois de maintenir cette solution aux environs de 0°. BOURDILLON, BRUCE et WEBSTER ont montré récemment, que s'il est conservé à la température de la chambre, l'ergostérol en solution huileuse perd environ 50 % de son activité en une année. Une perte du même ordre serait obtenue en trois jours,

à 100°. Au-dessous de 0°, la stabilité est d'autant plus grande que l'état solide de l'huile agit alors comme protecteur.

En vue d'apprécier l'activité des diverses sources de vitamine D, le Comité d'Hygiène de la Société des Nations, a précisément adopté comme étalon international, une solution d'ergostérol irradié rigoureusement titré par l'expérimentation physiologique, sur laquelle nous donnons tous détails utiles dans le paragraphe suivant. Ayant à notre disposition une quantité suffisante de cet étalon, nous nous sommes proposés de rechercher les quantités nécessaires pour obtenir à titre curatif et préventif, la calcification des jeunes rats soumis au régime rachitigène RANDOIN-LECOQ. Celle-ci, en effet, peut varier considérablement avec le régime mis en œuvre. Par exemple, le seul fait de ramener à 2, dans le régime rachitigène de STEENBOCK, le rapport Ca/P, qui est normalement égal à 4, correspond pratiquement à une ingestion quotidienne par l'animal de 0,7 unité de vitamine D. Nous nous proposons également de comparer l'action de l'étalon international de vitamine D et des différentes sources de phosphore actif étudiées au cours du chapitre précédent.

* * *

La Conférence Internationale sur l'Étalonnage des Vitamines qui s'est tenue, pour la première fois, à Londres, en Juin 1931, a proposé au Comité d'Hygiène de la Société des Nations, d'adopter (provisoirement au moins) comme étalon, la solution d'ergostérol irradié provenant du « National Institute for Medical Research » de Londres. Il était entendu que, par la suite, si cela devenait nécessaire les quantités disponibles étant épuisées, on remplacerait cette solution par un nouvel étalon dont l'équivalence serait déterminée par les Délégués-experts des différents pays, en comparaison avec le premier. C'est précisément ce qui s'est produit en Juin 1932.

Il est probable que l'étalon international de vitamine D ne restera pas immuable, l'ergostérol irradié n'étant pas un composé défini, et qu'il sera ultérieurement remplacé par la vitamine D cristallisée que plusieurs auteurs ont réussi à extraire. Quoiqu'il en soit, nous préciserons les conditions de préparation de l'étalon international actuel, nous aidant de la notice « M.19 » intitulée *Memorandum on the international standard for vitamin D and its application*.

Préparation. — L'ergostérol utilisé est une préparation commerciale ayant pour point de fusion : 160-163°.

Cet ergostérol a été dissous dans de l'éther éthylique sec, pur et débarrassé d'air, à une concentration de 3 grammes par litre (0,3 %) et exposé aux radiations non filtrées d'une lampe de quartz à vapeur de mercure, formée d'un tube vertical à vide (130 mm. $\times$ 18 mm.), utilisé avec une différence de potentiel de 115 volts aux extrémités de l'arc et un courant de 3,1 ampères. La lampe, incluse dans un cylindre de silice transparente, mesurait approximativement 250 mm. $\times$ 76 mm. Une spirale de silice, surmontant exactement le cylindre, avait un diamètre de 87 mm. et comprenait 42 tours.

La lampe, le cylindre et la spirale étaient immergés dans un vase de verre dans lequel on faisait circuler de l'eau froide, ce vase ayant un trou cerclé de liège dans sa partie basse pour le tube de sortie de la spirale. Par ce moyen, la spirale demeurait froide, la lampe étant protégée de l'eau froide par le cylindre de silice.

La solution d'ergostérol était conduite au travers de la spirale, au moyen d'un courant d'azote purifié, avec une pression telle que la vitesse du courant de la solution éthérée à travers la spirale fut de 25 cm. à la minute. La solution irradiée était reçue dans un vase rempli d'azote pur. L'irradiation terminée, on distilla l'éther dans le vide et l'ergostérol irradié fut dissous dans de l'huile d'olive, de façon à donner une solution à 0,1 %

(d'après le poids d'ergostérol soumis à l'irradiation et le volume d'huile d'olive utilisé pour dissoudre le produit irradié). Un essai quantitatif avec la digitonine montra que 72 % de l'ergostérol utilisé avait été transformé par irradiation en substances non précipitables par la digitonine.

Dix grammes d'ergostérol ont été irradiés et le produit obtenu a été dissous dans 10 litres d'huile d'olive.

Une comparaison de l'activité biologique de cette préparation avec celle de l'étalon original a été faite de la manière suivante : un échantillon de la solution à 0,1 % a été dilué avec de l'huile d'olive, de manière à donner 0,01 % (force de l'étalon original). Il fut comparé à cet étalon au moyen d'une épreuve de pouvoir antirachitique portant sur 234 rats, également répartis entre les deux solutions. C'est la méthode *curative* qui fut utilisée et les résultats furent appréciés par la radiographie.

Ces résultats montrèrent que le nouvel étalon (0,01 %) était 1,2 fois plus actif que le standard original. En se basant sur cet essai, la solution à 0,01 % du nouveau standard fut donc diluée au douzième (en volume), de manière à être équivalente au standard primitif.

Des échantillons du nouvel étalon et de l'étalon primitif furent alors expédiés aux institutions désignées par la Conférence de Londres en Juin 1931, afin que leurs activités antirachitiques puissent être étudiées comparativement par ces institutions. Les rapports reçus ont été unanimes à prouver que la dilution de la provision du nouvel étalon avait une activité rigoureusement équivalente à celle du standard original.

Définition de l'unité. — L'unité recommandée par la Conférence de Londres et acceptée par la Commission permanente des étalons biologiques de la SOCIÉTÉ DES NATIONS *correspond à l'activité en vitamine D de 1 milligramme de la solution internationale standard d'ergostérol irradié.*

Mode de répartition. — C'est le *National Institute for Medical*

Research, de Londres qui a été chargé de préparer et d'emmagasinier la solution standard et d'en distribuer, à chaque pays désirant l'utiliser, une quantité suffisante pour permettre l'application effective de l'étalon. Le *National Institute for Medical Research* représente donc le laboratoire central travaillant pour le Comité d'Hygiène de la Société des Nations.

Pour réduire les possibilités d'altération par exposition à l'air, il a été décidé de distribuer la solution avant l'expédition, dans des flacons bouchés en verre brun remplis de la solution, chaque flacon en contenant environ 10 cm³. Une quantité suffisante de ces flacons a été envoyée, dans chaque pays, à un Institut central spécialisé, afin que l'étalon puisse être remis aux laboratoires les utilisant, sans que les flacons aient été ouverts. Partout où cela fut indispensable, des arrangements doivent être pris pour envoyer les approvisionnements en emballage conservant le froid.

Il est nécessaire que le produit soit placé dans une glacière dont la température est inférieure à 0° centigrade immédiatement après la réception et que chaque récipient en renfermant soit conservé dans les mêmes conditions, excepté, évidemment, pendant le court intervalle de prélèvement des échantillons d'essais.

Au moment de préparer des dilutions, la solution étalon doit être sortie de la glacière et conservée dans un lieu frais et sombre du laboratoire pendant le temps suffisant pour permettre une complète liquéfaction. Le contenu du flacon doit être parfaitement mélangé avant le prélèvement de l'échantillon à diluer.

Conseils pour la dilution et l'utilisation de la préparation étalon. — Les dilutions à employer seront déterminées par la nature de l'essai adopté. En dehors de différences minimales dues au régime choisi et aux autres conditions, la dose nécessaire pour obtenir l'action curative sur le rachitisme expérimentalement provoqué sera de l'ordre de 10 fois la dose nécessaire à la prévention

du rachitisme avec le même régime. Dans chaque cas, il est désirable que la dose de produit international employée soit administrée directement et séparément à chaque rat, *sans être mélangée aux aliments*. Les dilutions doivent être effectuées de manière à ce que chaque dose soit contenue dans un volume facile à introduire sans perte dans la bouche du jeune rat. Ce volume sera mesuré exactement au moyen d'une microburette et ne devra jamais dépasser 100 mm³.

Certaines précautions doivent être prises pour la préparation des dilutions. L'huile utilisée doit être une huile végétale naturelle exempte de falsification et ne possédant pas d'action anti-rachitique par elle-même. Toutes ces dilutions doivent être soigneusement agitées pour assurer un mélange parfait, ce qui sera réalisé au mieux en faisant passer un courant rapide d'azote à travers le liquide.

Les dilutions de l'étalon doivent être faites à des *intervalles ne dépassant pas trois semaines*, et ensuite, elles doivent être conservées dans des récipients bien bouchés et maintenus dans un endroit frais et sombre.

Application pratique de l'étalon pour l'estimation comparative de la vitamine D. — Le contenu en vitamine D de la substance essayée doit être, *dans tous les cas*, estimé en le comparant *directement* avec la préparation étalon. Les portées d'animaux employées au cours des recherches doivent être partagées de telle manière qu'un nombre approximativement égal de chaque portée soit soumis à l'essai de la préparation étalon et à celui de la substance d'activité inconnue. Dans un lot d'animaux, on étudie les effets de doses connues de la préparation étalon de vitamine D et, dans une série d'animaux strictement comparable, on observe les effets d'une série de doses de la substance essayée. En déterminant la quantité de la substance essayée qui produit un effet biologique identique — ou le plus identique possible — à celui que produit une dose connue de l'étalon international, il est

aisé de connaître ensuite le nombre d'unités de vitamine D, correspondant à une quantité donnée de la substance essayée.

*
* *

L'*unité de vitamine D* internationale, tel qu'il est défini dans les publications officielles, correspond, comme nous venons de le voir, à l'activité de 1 milligramme de la solution huileuse d'ergostérol utilisée comme étalon.

Bien qu'il soit conseillé d'utiliser la méthode curative pour l'essai des préparations actives, il n'est pas précisé si l'unité de vitamine D correspond à la dose suffisante pour guérir le rachitisme de rats préalablement soumis pendant 21 jours à l'un des régimes rachitigènes les plus utilisés dans les pays anglo-saxons, le régime de PAPPENHEIMER, de MC COLLUM ou de STEENBOCK par exemple. Cela apparaît cependant comme très vraisemblable. Il est certain par contre, qu'elle diffère de l'unité physiologique de LESNÉ et CLÉMENT, définie par ces auteurs comme la dose quotidienne nécessaire pour protéger contre le rachitisme, le jeune rat blanc de 25 à 30 grammes mis au régime D de PAPPENHEIMER.

Le régime rachitigène RL, étant considéré comme plus sévère que les régimes précédents, nous avons pensé qu'il faudrait plus d'une unité internationale par jour pour obtenir la guérison de nos animaux dans les conditions habituelles d'expérience, comportant l'emploi de rats de 35 à 45 grammes rachitisés en 6-8 jours et traités ensuite 10 jours.

A cet effet, nous avons préparé des dilutions de l'étalon avec 0 gr. 50, 0 gr. 55, 0 gr. 60, 0 gr. 65, 0 gr. 70, 0 gr. 75 etc. étendues à 50 cc. avec de l'huile d'olive lavée à l'alcool et correspondant à 1 unité, 1 unité 1, 1 unité 2, etc. par dixième de centimètre cube, exactement mesuré, chaque jour et par animal.

La dose curative minima fut trouvée, dans ces conditions, de

une unité quatre dixièmes, de façon constante. Au-dessous, la calcification osseuse des rats rachitiques s'avérait insuffisante; au-dessus, elle n'apparaissait pas sensiblement meilleure.

L'essai *préventif*, effectué dans les mêmes conditions mais à des doses plus faibles, données dès le début de l'expérience et prolongées pendant six à dix-huit jours, nous a montré que le dixième de la dose curative minima est incontestablement inefficace, une action antirachitique juste suffisante n'étant obtenue qu'avec *sept à huit dixièmes* d'unité internationale, soit environ la moitié de la dose curative.

Ces résultats, présentés avec LECOQ à la Société des Experts chimistes (séance de juin 1933), ne correspondent pas aux résultats publiés récemment par Mme RANDOIN. Celle-ci n'opère d'ailleurs pas exactement dans les mêmes conditions que nous. Elle emploie constamment des rats de 30 grammes et, détail qui a son importance (qu'une erreur d'impression ne met pas en évidence dans son travail), elle ajoute en supplément au régime RL type, 1 gr. % de lactate de calcium, ce qui en accentue la sévérité. En outre, elle ne recherche pas la dose limite, mais la dose préventive et curative produisant un effet maximum. Dans ces conditions, il convient d'utiliser 5 unités internationales de vitamine D pour obtenir une parfaite calcification.

Pour notre compte, nous avons repris nos essais antérieurs que nous confirmons. Nous avons eu soin de n'utiliser que des dilutions faites récemment avec de l'huile d'olive lavée à l'alcool (selon la technique décrite dans la Pharmacopée française), et conservées, entre temps, à la glacière.

Par comparaison et selon la technique précédente, nous avons pu déterminer la richesse en vitamine D de diverses solutions huileuses d'ergostérol irradiées. Quoique les fournisseurs accusent des teneurs identiques d'ergostérol, les richesses en vitamine D pouvaient varier considérablement, celles-ci étant vraisemblablement en rapport avec la technique d'irradiation appliquée.

* * *

Au cours des essais précédents, la dose curative d'ergostérol irradiée ingérée fut toujours donnée *à part*, ainsi qu'il est conseillé. Les résultats obtenus ne sauraient être directement comparés avec ceux du chapitre précédent, où les dérivés du phosphore se trouvaient intimement mélangés à la ration. Il est admis en effet que les doses de vitamine D, nécessaires sont moindres lorsque celles-ci sont administrées hors des aliments.

Nous avons donc effectué une nouvelle série d'expériences dans lesquelles 10, 14, 16, 18, 20, 25 et 30 unités internationales d'ergostérol irradié ont été incorporées à 100 grammes de régime rachitigène RL. Ce mélange était donné comme d'ordinaire, aux animaux préalablement rachitisés pendant 10 jours. La radiographie permettait de juger ensuite la calcification.

Il fut trouvé ainsi que la dose de 20 unités pour 100 grammes donne des résultats régulièrement positifs, les doses de 18 à 10 unités se montrant de plus en plus insuffisantes et les doses supérieures n'étant pas sensiblement plus actives.

Sachant qu'une calcification du même ordre est obtenue avec :

0 gr. 50 d'acide phosphorique officinal
0 gr. 57 de phosphate monocalcique
1 gr. 55 de phosphate bicalcique
0 gr. 45 de phosphate monosodique
1 gr. 17 de phosphate disodique
1 gr. 75 de phosphate trisodique
1 gr. 50 de pyrophosphate de sodium
1 gr. de métaphosphate de sodium
0 gr. 40 de phosphate monopotassique
0 gr. 57 de phosphate bipotassique
0 gr. 38 de phosphate monoammonique
0 gr. 50 de phosphate biammonique

il devient aisé d'exprimer en unités internationales antirachitiques l'activité des divers phosphates rapportés au gramme.

Par exemple, on dira que :

1 gr. d'acide phosphorique officinal se montre doué d'une activité antirachitique correspondant à	40 unités internationales de vitamine D.
1 gr. de phosphate monocalcique	35 — —
1 gr. de phosphate bicalcique	13 — —
1 gr. de phosphate monosodique	44 — —
1 gr. de phosphate disodique.....	17 — —
1 gr. de phosphate trisodique	11 — —
1 gr. de pyrophosphate de sodium.....	13 — —
1 gr. de métaphosphate de sodium	20 — —
1 gr. de phosphate monopotassique	50 — —
1 gr. de phosphate bipotassique	35 — —
1 gr. de phosphate monoammonique	53 — —
1 gr. de phosphate biammonique	40 — —

D'autre manière, tenant compte de la teneur en phosphore des divers éléments phosphoriques et sachant que la calcification est obtenue par incorporation à 100 grammes de ration de :

80 milligr. de phosphore, sous forme d'acide phosphorique,	
90 — — — sous forme de phosphate monosodique,	
100 — — — sous forme de phosphate disodique,	
140 — — — sous forme de phosphate trisodique,	
200 — — — sous forme de pyrophosphate de sodium,	
300 — — — sous forme de métaphosphate de sodium,	

on dira que l'action curative antirachitique d'une *unité internationale de vitamine D* est équivalente à environ :

4 milligr. de phosphore, sous forme d'acide phosphorique officinal,	
4,5 — — — sous forme d'orthophosphate monosodique	
5 — — — sous forme d'orthophosphate disodique,	
7 — — — sous forme d'orthophosphate trisodique,	
10 — — — sous forme de pyrophosphate de sodium,	
15 — — — sous forme de métaphosphate de sodium.	

* * *

En conclusion, l'étalon ou standard international de vitamine D donné à part de la ration doit être employé quotidienne-

ment à la dose de une unité quatre dixièmes par animal pour exercer une action curative satisfaisante sur des rats de 35 à 45 grammes, préalablement rachitisés à l'aide du régime RANDOIN-LECOQ. La dose préventive d'ergostérol irradié est, dans les mêmes conditions, voisine de la moitié de la dose curative. Il faut ajouter environ 20 unités internationales de vitamine D à 100 grammes du même régime rachitigène pour conférer à la ration, dans les conditions de l'expérience, une action curative antirachitique satisfaisante. L'efficacité d'un dérivé phosphorique peut être exprimée comparativement en unités internationales antirachitiques et rapportée soit à un gramme de substance, soit à un poids déterminé de phosphore.

RÉSUMÉ

ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

I. — Un régime rachitigène donné à de jeunes rats fait varier le pH fécal des animaux qui le reçoivent vers l'alcalinité; mais cette alcalinité régresse quand on ajoute à la ration, des doses suffisantes de vitamine D sous forme d'ergostérol irradié.

II. — En même temps que le rachitisme s'installe chez le rat sous l'influence d'un régime approprié, on note diverses modifications humorales dont la plus importante et la plus constante est l'hypophosphatémie.

III. — L'alcalinité du tractus digestif comme l'hypophosphatémie ne figurent cependant pas parmi les caractères indispensables du rachitisme expérimental, celui-ci est avant tout caractérisé par des lésions osseuses et une décalcification typiques

IV. — Un pH fécal fortement alcalin peut correspondre à une ration artificielle assurant un développement normal des animaux sans troubles osseux.

V. — Le régime RANDOIN-LECOQ que nous avons utilisé dans nos expériences, lorsqu'il est convenablement appliqué, permet chez le rat, l'obtention en six à huit jours d'un rachitisme expérimental caractéristique, en même temps qu'une bonne croissance (rachitisme floride).

VI. — L'adjonction de bacilles lactiques à un régime rachitigène entrave l'évolution du pH fécal vers l'alcalinité, mais n'empêche pas l'apparition de manifestations osseuses rachitiques.

VII. — L'introduction de lactose dans le même régime en remplacement du saccharose est suivie d'une acidification du pH fécal, mais aussi, très fréquemment, d'une calcification osseuse anormale due à l'inanition provoquée par le déséquilibre alimentaire apporté ainsi dans la ration.

VIII. — Si, d'une façon générale, la quantité de bacilles lactiques et d'acide lactique produit parallèlement sur bouillon de touraillon carbonaté s'accroît avec le temps, il ne semble pas y avoir proportionnalité entre la durée de l'expérience et la quantité de bacilles développés, pas plus qu'entre la quantité de bacilles et l'acide lactique produits. La rapidité de développement des bacilles, comme le taux d'acide lactique produit dans la culture, dépendent avant tout de la race des bacilles mis en œuvre.

IX. — Les comprimés commerciaux de bacilles lactiques sont de valeur très inégale; certains apportent, en outre, des éléments de contamination indésirables.

X. — Dans la limite des examens bactériologiques effectués, il ne semble pas que la flore intestinale soit sensiblement modifiée chez le rat, quand on passe de l'alimentation variée à un régime rachitigène, compensé ou non par addition d'ergostérol irradié.

XI. — A l'opposé des groupes hypophosphoreux PO^2 et phosphoreux P^2O^3 , qui se montrent sans activité antirachitique le groupe phosphorique P^2O^5 apparaît doué, sous ses diverses formes, d'une efficacité indiscutable.

XII. — La calcification osseuse due au groupe phosphorique P^2O^5 se montre en rapport avec le nombre de molécules d'eau fixées par celui-ci et entrant dans la constitution des sels essayés. Pour produire des effets identiques, il faut ajouter à 100 parties du régime rachitigène RL 0,100 de phosphore sous forme d'orthophosphate disodique; 0,200 de phosphore sous

forme de pyrophosphate et 0,300 de phosphore sous forme de métaphosphate de sodium.

XIII. — L'activité antirachitique des orthophosphates mono- et disodique, se montre très comparable à celle des orthophosphates mono- et bipotassique, compte tenu de la proportion de phosphore apporté par ces différentes substances; l'activité des sels mono- et biammonique paraît, dans les mêmes conditions, légèrement inférieure.

XIV. — Les propriétés calcifiantes des orthophosphates allant en diminuant du sel monosodique au trisodique, du monopotassique au bipotassique et du monoammonique au biammonique, l'efficacité des sels orthophosphoriques en rapport avec le nombre de fonctions acides libres qu'il renferme, établie par LECOQ et VILLUIS, semble définitivement démontrée.

XV. — En confirmation des faits, observés antérieurement, à l'aide d'autres régimes rachitigènes, les carbonates de calcium, de magnésium et de strontium, ajoutés à la dose de 2 % au régime rachitigène RL, en augmentent la sévérité, entraînant la production d'un rachitisme hypotrophique. Le magnésium et le strontium l'emportent dans cette action sur le calcium.

XVI. — Les carbonates ferreux et manganoux se montrent des anti-fixateurs du calcium, tout aussi énergiques que les carbonates de magnésium et de strontium.

XVII. — Engagés dans la combinaison chimique des phosphates, le strontium et le magnésium n'empêchent cependant pas, surtout aux doses faibles, l'action de P^2O^5 sur la calcification osseuse des rats rachitiques; par contre, dans les mêmes conditions, le calcium entrave manifestement cette calcification.

XVIII. — Le fer, le manganèse et le bismuth inhibent (au moins dans des proportions assez étendues) l'activité antirachitique du radical phosphorique auquel ils se trouvent associés.

XIX. — Le métal influe doublement, semble-t-il, sur l'activité des phosphates le renfermant, d'abord par sa nature propre, ensuite par le nombre des fonctions acides qu'il salifie.

XX. — L'étalon ou standard international de vitamine D donné à part de la ration doit être employé quotidiennement à la dose d'une unité quatre dixièmes par animal pour exercer une action curative satisfaisante sur des rats de 35 à 45 grammes préalablement rachitisés à l'aide du régime RL; la dose préventive d'ergostérol irradié est dans les mêmes conditions, voisine de la moitié de la dose curative.

XXI. — L'activité curative antirachitique des composés du phosphore peut être exprimée comparativement à celle de l'ergostérol irradié en unités internationales de vitamine D; il convient alors, bien entendu, de se placer dans les mêmes conditions opératoires : l'étalon est, dans ce cas, incorporé à la ration.

XXII. — Dans l'analyse biologique de produits complexes, il faut retenir que les deux activités (vitaminique et phosphorique) additionnent leurs effets, si l'on n'a eu soin de les séparer auparavant à l'aide de solvants appropriés.

BIBLIOGRAPHIE

- ACKERSON (C.-W.), BLISCH (M.-J.) et MUSSEHL (F.-E.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1925, **63**, p. 75.
- ADAMS (G.) et Mc COLLUM (E.-V.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1928, **78**, p. 495.
- ALQUIER (J.). — *Bull. Soc. Hyg. alim.*, 1930, **18**, p. 51.
- ANDRÉ (E.) et LECOQ (R.). — *C. R. Ac. Sc.*, 1932, **194**, p. 912, *Journ. Pharm. et Chim.*, 1932, [8], **16**, p. 321.
- BACHARACH (A.-L.) et JEPHCOTT (H.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1929, **82**, p. 751.
- BACHRACH (E.) et CARDOT (H.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1922, p. 1127.
- BANU (G.). — *Le Nourrisson*, 1921, **9**, p. 229.
- BENJAMIN (H.-R.) et HESS (A.-F.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1933, **100**, p. 27.
- BENJAMIN (H.-R.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1933, **100**, p. 57.
- BERTHELOT (A.) et BERTRAND (D.-M.). — *Ann. Falsif. et Fraudes*, 1912, **5**, p. 165.
- BERTRAND (G.) et DUCHACEK (F.). — *Ann. Inst. Past.*, 1909, **23**, p. 402.
- BLUM (L.), DELAVILLE (M.) et VAN CAULAERT. — *C. R. Soc. Biol.*, 1924, **91**, p. 1292; *C. R. Soc. Biol.*, 1925, **92**, p. 184; *Presse Medicale*, 1926, **38**, p. 801.
- BODANSKY (A.), JAFFE (H.-L.) et CHANDLER (J.-P.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1932, **97**, *Sc. Proceed.*, p. LXVI.
- BOURDILLON (R.-B.), BRUCE (H.-M.) et WEBSTER (T.-A.). — *Biochem. Journ.*, 1932, **26**, p. 522.
- BROWN (H.-B.), SHOHL (A.-T.), CHAPMAN (E.-E.), ROSE (C.-S.), SAURWEIN (E.-M.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1932, **98**, p. 207.

- CAUQUIL (G.). — *Thèse Doct. Méd.*, Toulouse, 1928.
- CAVINS (A.-W.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1924, **59**, p. 237.
- COHENDY (M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1906, **60**, p. 558 et p. 602.
- COWARD (K.-H.), KEY (K.-M.) et MORGAN (B.-G.-E.). — *Biochem Journ.*, 1932, **26**, p. 101.
- CLARK (E.-P.), COLLIP (J.-B.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1925, **63**, p. 461.
- DARRICAU. — *Rev. Patbol. Comp. et Hyg. gen.*, 1929, **29**, p. 1011.
- DEBRAY (J.). — *Thèse Doct. Méd.*, Paris, 1925.
- DE GENNES (L.). — *Thèse Doct. Méd.*, Paris, 1924.
- DORLENCOURT (H.). — *Rev. de Patbol. comp. et Hyg. gen.*, 1923, **23**, p. 629.
- EDERER (S.-A.-P.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1924, **64**, p. 621.
- EFFRONT (J.). — *Mon. Sc. Quesneville*, 1911, p. 489.
- FABRE (R.). — *Pharmacie française*, 1929, **33**, p. 163.
- FABRE (R.). — *Pharmacie française*, 1931, **35**, p. 155.
- GRAYZEL (D.-M.) et MILLER (E.-G.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1928, **76**, p. 423.
- GREAVES (J.-D.) et SCHMIDT (C.-L.-A.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1933, **102**, p. 101.
- GRIMBERT (L.). — *Journ. Pharm. et Chim.*, 1909, [6], **29**, p. 595.
- GRIGOROFF. — *Rev. Méd. de Suisse Romande*, 1905, **25**, p. 714.
- HAURY (V.-G.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1930, **89**, p. 467.
- HESS (A.-F.), WEINSTOCK (M.), RIVKIN (H.) et GROSS (J.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1930, **87**, p. 37.
- HESS (A.-F.), BERLINER (F.-S.) et WEINSTOCK (M.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1931, **94**, p. 9.
- HESS (A.-F.), GROSS (J.), WEINSTOCK (M.) et BERLINER (F.-S.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1932, **98**, p. 625.
- HOLMES (A.-D.) et TRIPP (F.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1932, **97**, *Sc. Proceed.*, p. IX.
- HOLT (L.-E.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1925, **64**, p. 579.
- HOWLAND (J.) et KRAMER (B.). — *Tr. Am. Pediatr. Soc.*, 1922, **34**, p. 204; *Monatsschr. Kinderheilk.*, 1923, **25**, p. 279.
- JEPHCOTT (H.) et BACHARACH (A.-L.). — *Biochem. Journ.*, 1928, **22**, p. 60.
- JOURDAIN (Dr. V.) et SIMONNET (H.). — *L'ergostérol irradié devant l'expérimentation et la clinique*, Paris, 1929.
- KARELITZ (S.) et SHOHL (A.-T.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1927, **73**, p. 655.
- KAY (H.-D.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1930, **89**, p. 235 et p. 249.

- KAY (H.-D.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1932, **99**, p. 85.
- KAYSER (E.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1894, **8**, p. 737, *Bull. Inst. Pasteur*, 1905, **3**, p. 144.
- KEY (K.-M.) et MORGAN (B.-G.-E.). — *Biochem. Journ.*, 1932, **26**, p. 196.
- KLETZIEN (S.-W.-F.), THOMAS (B.-H.), TEMPLIN (V.-M.) et STEENBOCK (H.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1931, **92**, *Sc. Proceed.*, p. IX.
- KLINE (O.-L.), KEANAN (J.-A.), ELVEHJEM (C.-A.) et HART (E.-B.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1932, **98**, p. 121.
- KRAMER (B.), SHEAR (M.-J.) et SIEGEL (J.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1931, **91**, p. 271.
- LEBEAU (P.) et COURTOIS (C.). — *Traité de Pharmacie chimique*, Paris, 1929.
- LECOQ (R.). — *Thèse Doct. Sc.*, Paris, 1928.
- LECOQ (R.). — *Pharmacie Française*, 1928, **32**, p. 103.
- LECOQ (R.). — *Les Aliments et la Vie*, 2^e éd., Paris, 1929.
- LECOQ (R.). — *Rev. Pathol. comp. et Hyg. gen.*, 1929, **29**, p. 63.
- LECOQ (R.). — *Bull. Doct. Pharm.*, 1930, [2], **19**, p. 140.
- LECOQ (R.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **108**, p. 399.
- LECOQ (R.). — *C. R. Ac. Sc.*, 1931, **193**, p. 442.
- LECOQ (R.) et HUERRE (R.). — *Bull. Soc. Thérap.*, 1932, [13], **37**, p. 162.
- LECOQ (R.) et SAVARE (J.). — *C. R. Ac. Sc.*, 1933, **196**, p. 1693.
- LECOQ (R.) et SAVARE (J.). — *C. R. Ac. Sc.*, 1934, **198**, p. 1540.
- LECOQ (R.) et VILLETTE (H.). — *Ann. Falsif. et Fraudes*, 1933, **26**, p. 409.
- LECOQ (R.) et VILLETTE (H.). — *Journ. Pharm. et Chim.*, 1933, [8], **18**, p. 192.
- LECOQ (R.) et VILLETTE (H.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **112**, p. 1051.
- LECOQ (R.) et VILLETTE (H.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **114**, p. 1094 et p. 1096.
- LECOQ (R.) et VILLETTE (H.). — *Bull. Doct. Pharm.*, 1934, [2], **23**, p. 12.
- LECOQ (R.) et VILLETTE (H.). — *Journ. Pharm. et Chim.*, 1934, [8], **19**, p. 201.
- LECOQ (R.) et VILLUIS (F.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **109**, p. 539 et p. 630.
- LECOQ (R.) et VILLUIS (F.). — *Journ. Pharm. et Chim.*, 1932, [8], **15**, p. 393.
- LECOQ (R.) et VILLUIS (F.). — *Pharmacie française*, 1933, **37**, p. 2.
- LEENHARDT (E.) et CHAPTAL (J.). — *Rev. Fr. de Pédiatrie*, 1927, **3**, p. 641.
- LESNÉ (E.) et DE GENNES (L.). — *C. R. Ac. Sc.*, 1923, **177**, p. 1160.
- LESNÉ (E.), DE GENNES (L.) et GUILLAUMIN (Ch. O.). — *C. R. Ac. Sciences*, 1923, **177**, p. 1160.

- LESNÉ (E.). et CLÉMENT (R.). — *Presse Méd.*, 1928, **36**, p. 1254.
- LIEUX (A.). — *Thèse Doct. Méd.*, Lyon, 1922.
- LUERSSEN (A.) et KUHN. — *Centralbl. f. Bakt. Parasit. und Infekt.*, 1908, **20**, p. 234.
- Mc CANN (G.-F.) et BARNETT (M.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1922, **54**, p. 203.
- Mc CLENDON (J.-F.). — *Amer. Journ. Physiol.*, 1922, **61**, p. 373.
- Mc COLLUM (E.-V.), SIMMONDS (N.), SHIPLEY (P.-G.) et PARK (E.-A.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1921, **47**, p. 507.
- MAHEU (J.). — *Thèse Doct. Méd.*, Paris, 1921.
- MAHEU (J.). — *Le Lait*, 1922, **2**, N° 6.
- MARFAN (A.-B.). — *Quatre leçons sur le rachitisme*, Paris 1923.
- MARFAN (A.-B.). — *Le Nourrisson*, 1923, **11**, p. 121.
- MARFAN (A.-B.). — *Presse Méd.*, 1925, **33**, p. 49, p. 97 et p. 161.
- MARFAN (A.-B.). — *Presse Méd.*, 1932, **40**, p. 561.
- MARFAN (A.-B.). — *Gazette des Hôpitaux*, 1933, **106**, p. 115.
- METCHNIKOFF (E.). — Quelques remarques sur le lait aigri. Paris S. D. et *Revue Scientifique*, 1904, **2**, p. 103.
- MELLANBY (E.). — *Lancet*, 1919, **197** (I), p. 407 et 1920, **198** (I), p. 856. *Med. Res. Comm. Spec. Repts ser.*, 1921, N° 61.
- MEYER (G.). — *Klin. Woch.*, 1932, **11**, p. 1796.
- MOURIQUAND (G.). — *Paris-Médical*, 1923, **13**, p. 406.
- MOURIQUAND (G.), LEULIER (A.), BERNHEIM (M.) et WEILL (L.). — *Presse Méd.*, 1931, **43**, N° 42, p. 769.
- MOURIQUAND (G.), LEULIER (A.) et NOGIER. — *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **106**, p. 19.
- MOURIQUAND (G.), LEULIER (A.) et ROCHE (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **107**, p. 676.
- MOURIQUAND (G.), LEULIER (A.), BERNHEIM (M.) et WEILL (L.). — *Bull. Ac. Méd.*, 1932, [3], **107**, p. 797.
- MOURIQUAND (G.), LEULIER (A.) et Mlle WEILL (L.). — *C. R. Ac. Sc.*, 1932, **194**, p. 1201.
- MOURIQUAND (G.) et LEULIER (A.). — *C. R. Ac. Sc.*, 1934, **198**, p. 208.
- MURRAY (L.). — *Brit. Journ. Exp. Pathol.*, 1923, **4**, p. 335.
- OSER (B.-L.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1928, **80**, p. 487.
- PAPPENHEIMER (A.), Mc CANN (G.-F.), et ZUCKER (T.-F.). — *Journ. of exp. Med.*, 1922, **35**, p. 421.
- PAPPENHEIMER (A.). — *Journ. Méd. de Lyon*, 1923, **4**, p. 281.

- POLICARD (A.), PEHU (M.) et BOUCOMONT (J.). — *Presse Méd.*, 1934, **46**, p. 41.
- Mme RANDOIN (L.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1931, **13**, p. 1278.
- Mme RANDOIN (L.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1934, **16**, p. 426.
- Mme RANDOIN (L.) et LECOQ (R.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1927, **97**, p. 1277.
- Mme RANDOIN (L.) et LECOQ (R.). — *Ann. Falsif. et Fraudes*, 1928, **21**, p. 68.
- Mme RANDOIN (L.) et LECOQ (R.). — *Journ. Pharm. et Chim.*, 1929, [8], **10**, p. 496.
- Mme RANDOIN (L.) et LECOQ (R.). — *C. R. Ac. Sc.*, 1930, **191**, p. 732.
- REDMAN (T.), VILLIMOTT (S.-G.) et VOKES (F.). — *Biochem. Journ.*, 1927, **21**, p. 589.
- REGNIER (J.) et NEIPP (L.). — *Bull. Sc. pharmacol.*, 1934, **41**, p. 152, 231 et 291.
- REMOND (A.), SOULA (L.-C.) et CAUQUIL (G.). — *Bull. Ac. Méd.*, 1928, [3], **100**, p. 825.
- Mme ROCHE (A.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1932, **14**, p. 634.
- ROGOZINSKI (F.) et STARZEWSKA (M.). — *Bull. Ac. polonaise Sc. et Lettres*, Série B, II, 1930, p. 157.
- ROGOZINSKI (F.). — *Bull. Ac. pol. Sc. et Lettres*, Série B, II, 1931, p. 1 et p. 155.
- RUSSEL (W.-C.), TAYLOR (M.-W.) et WILCOX (D.-E.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1932, **99**, p. 109.
- SERONO (C.). — *Press. Méd.*, 1927, **39**, p. 1363.
- SHELLING (D.-H.). — *Thèse*, Yale University, 1925.
- SHELLING (H.-D.), KRAMER (B.) et ORENT (E.-R.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1928, **77**, p. 157.
- SHERMAN (H.-C.) et PAPPENHEIMER (A.-M.). — *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, 1920, **18**, p. 193. *Journ. of exp. Med.*, 1921, **34**, p. 189.
- SHERMAN (H.-C.) et PAPPENHEIMER (A.-M.). — *Proceed Soc. exp. Biol. and Med.*, 1921, **18**, p. 193.
- SHERMAN (H.-C.) et STIEBELING (H.-K.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1929, **83**, p. 497.
- SHIPLEY (P.-G.), PARK (E.-A.), Mc COLLUM (E.-V.) et SIMMONDS (N.). — *Johns Hopkins Hosp. Bull.*, 1922, **33**, p. 216.
- SHIPLEY (P.-G.). — *Johns Hopkins Hosp. Bull.*, 1924, **35**, p. 304.
- SHOHL (A.-T.) et BENNETT (H.-B.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1928, **76**, p. 633 et p. 641.

- SHOHL (A.-T.), BENNETT (H.-B.) et WEED (A.-L.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1928, **78**, p. 257.
- SHOHL (A.-T.), BROWN (H.-B.), CHAPMAN (E.-E.), ROSE (C.-S.) et SAURWEIN (E.-M.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1932, **98**, p. 215.
- SGARE (F.-J.) et ELVEHJEM (C.-A.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1932, **97**, p. 511.
- STEENBOCK (H.) et BLACK (A.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1924, **61**, p. 405.
- STEENBOCK (H.) et BLACK (A.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1925, **64**, p. 263.
- STEENBOCK (H.), NELSON (M.-T.) et BLACK (A.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1924, **62**, p. 275.
- TANRET (C.). — *C. R. Ac. Sc.*, 1889, **108**, p. 98 ; 1908, **147**, p. 75.
- TANRET (G.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1933, **15**, p. 1346.
- TIXIER (G.). — *Bull. Ac. Méd.*, 1931, **106**, p. 91 et p. 93.
- TIXIER (G.). — *Pharmacie française*, 1932, **36**, p. 112 et p. 114.
- VENULET (F.) et GOEBEL (F.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **111**, p. 1026.
- VILLETTE (H.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **116**, p. 315.
- VILLUIS (F.). — *Thèse Doct. Pharm.*, Paris, 1932.
- VILLUIS (F.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **110**, p. 469.
- WOENCKENHAUS (E.). — *Arch. Exp. Path. Pharmak.*, 1927, **122**, p. 44.
- YODER (E.). — *Journ. of Biol. Chem.*, 1927, **74**, p. 321.
- ZUCKER (T.-F.), JOHNSON (W.-C.) et BARNETT (M.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1922, **20**, p. 20.
- ZUCKER (T.-F.) et MATZNER (M.-J.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1923, **21**, p. 186.

Vu, bon à imprimer,
Le Président de la Thèse,
HÉRISSEY.

Vu.
Le Doyen de la Faculté,
Paul GUÉRIN.

Vu et permis d'imprimer,
Le Recteur de l'Académie de Paris,
S. CHARLÉTY.

TABLE DES MATIÈRES

PAGES

Introduction	I
I. — Modifications Intestinales et Humorales observées dans le Rachitisme	5
II. — Étude des Bacilles Lactiques et de leur Action sur le Rachitisme expérimental	21
III. — Influence de quelques Composés inorganiques du Phosphore sur l'Évolution du Rachitisme expérimental	37
IV. — Comparaison de l'Activité Antirachitique de l'Ergostérol Irradié et des Composés Phosphorés	53
Résumé et Conclusions générales	65
Bibliographie	69
Table des Matières	75

IMPRIMERIE CH. BRANDE

. LE VÉSINET (S.-&-O.) .
